

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/12 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2021109499, 06.04.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.04.2021Дата регистрации:
28.10.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.04.2021

(45) Опубликовано: 28.10.2021 Бюл. № 31

Адрес для переписки:

195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая,
29, Центр интеллектуальной собственности и
трансфера технологий ФГАОУ ВО "СПбПУ",
Кадиев Ислам Гаджиевич

(72) Автор(ы):

Аронова Екатерина Борисовна (RU),
Базарнова Юлия Генриховна (RU),
Смятская Юлия Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Санкт-Петербургский
политехнический университет Петра
Великого" (ФГАОУ ВО "СПбПУ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ЧЕЛЕБИЕВА Э.С., и др.,
Физиолого-биохимические характеристики
микроводоросли *Ettlia Carotinosa Komárek* 1989 (*Chlorophyceae*) в условиях
экспериментального стресса, , 2-е изд.
Севастополь: Морський Екологічний журнал,
2013. - с. 78-87. КУЗНЕЦОВА Т.А.,
Направленное культивирование *Chlorella*
sorokiniana с целью увеличения синтеза
каротиноидов, (см. прод.)(54) Способ направленного культивирования биомассы микроводоросли *Chlorella sorokiniana*

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой способ направленного культивирования, в котором маточную культуру микроводорослей *Chlorella sorokiniana* предварительно готовят в виде клеточной суспензии, которую помещают в фотобиореактор, проводят аэрацию клеточной суспензии, соблюдая температурный режим, и освещают в режиме «день/ночь», при этом аэрацию проводят в режиме 1,3-1,7 л/мин, поддерживают температуру культивирования 21-24°C, освещение проводят световым потоком

2800-3200 лм в режиме 12 часов в сутки «день», 12 часов в сутки «ночь», в составе базовой питательной среды используют смесь добавок 3% перекиси водорода и пиридоксина в соотношении 0,1-0,3 мл и 6-16 мл на 10 л питательной среды соответственно. Изобретение позволяет повысить содержание каротиноидов в сухой биомассе микроводоросли *Chlorella sorokiniana* путем направленного культивирования, которое проводят в подобранном режиме. 1 з.п. ф-лы, 4 ил., 1 табл.

(56) (продолжение):

Вестник ВГУИТ, 2019, т. 81. CROFCHECK C. A., et al, Influence of media composition on the growth rate of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* utilized for CO₂ mitigation, J. Biochem.Tech. - 2012., 4(2) - p. 589-594..

R U 2 7 5 8 3 5 5 C 1

R U 2 7 5 8 3 5 5 C 1

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12N 1/12 (2021.08)

(21)(22) Application: 2021109499, 06.04.2021

(24) Effective date for property rights:
06.04.2021Registration date:
28.10.2021

Priority:

(22) Date of filing: 06.04.2021

(45) Date of publication: 28.10.2021 Bull. № 31

Mail address:

195251, Sankt-Peterburg, ul. Politekhnicheskaya,
29, Tsentr intellektualnoj sobstvennosti i transfera
tekhnologij FGAOU VO "SPbPU", Kadiev Ismail
Gadzhievich

(72) Inventor(s):

Aronova Ekaterina Borisovna (RU),
Bazarnova Iuliia Genrikhovna (RU),
Smiatskaia Iuliia Aleksandrovna (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Sankt-Peterburgskii
politekhnicheskii universitet Petra Velikogo"
(FGAOU VO "SPbPU") (RU)C1
5
5
3
5
8
3
5
5
2
7
RUR
U
2
7
5
8
3
5
5
C1

(54) METHOD FOR DIRECTED CULTIVATION OF MICROALGAE BIOMASS CHLORELLA SOROKINIANA

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. The invention is a method for directed cultivation, in which the mother culture of microalgae Chlorella sorokiniana is preliminarily prepared in the form of a cell suspension, which is placed in a photobioreactor, the cell suspension is aerated, observing the temperature regime, and illuminated in a day/night mode, while aeration is carried out in mode 1.3-1.7 l/min, maintain the cultivation temperature at 21-24°C, lighting is carried out with a luminous flux

of 2800-3200 ml in the mode 12 hours a day "day", 12 hours a day "night", a mixture of additives of 3% hydrogen peroxide and pyridoxine in a ratio of 0.1-0.3 ml is used as part of the basic nutrient medium and 6-16 ml per 10 l of culture medium, respectively.

EFFECT: increased content of carotenoids in dry biomass of microalgae Chlorella sorokiniana by directional cultivation, which is carried out in a selected mode.

2 cl, 4 dwg, 1 tbl

Изобретение относится к области микробиологической промышленности, в частности к производству пищевых добавок из непищевого сырья с помощью микроорганизмов, и позволяет получать биомассу с высоким содержанием каротиноидов путем направленного культивирования микроводоросли вида *Chlorella sorokiniana*.

Биомасса микроводоросли *Chlorella sorokiniana* является альтернативным источником ценных пищевых веществ, в том числе фотосинтетических пигментов - хлорофиллов и каротиноидов и представляет интерес в качестве промышленного источника каротиноидных пигментов. Химический состав вида *Chlorella sorokiniana* характеризуется наличием широкого спектра каротиноидных пигментов - α - и β -каротина, фукосантин, атаксантина, лютеина, виолаксантина и зеаксантина.

Технологии направленного культивирования микроводорослей нацелены на получение биомассы с заданным составом. С помощью варьирования условий культивирования возможно стимулировать биосинтез вторичных каротиноидов [1]. Получаемая биомасса с высоким содержанием каротиноидов может применяться в различных отраслях пищевой и фармацевтической промышленности в качестве биодобавки в составе рецептур функциональных продуктов питания для снижения дефицита витамина А у детей и взрослых, проживающих в регионах с повышенной экологической нагрузкой, а также в качестве вспомогательной терапии пациентов с диагностированным раком толстой кишки или для профилактики пациентов подверженных риску онкологических заболеваний [2]. Также биомасса микроводоросли *Chlorella sorokiniana* представляет интерес в качестве кормовой добавки [3].

Известен способ направленного культивирования *Chlorella vulgaris* авторов: Н.П. Дмитрович, А.С. Крыльчук и Н.А. Симончик [4]. Данное техническое решение предполагает культивирование микроводоросли на питательных средах с пониженным содержанием азота с целью стимулирования синтеза липофильных соединений, в том числе, каротиноидов, в условиях азотного голодания. К недостаткам данного решения относится длительный период культивирования и незначительный прирост биомассы.

Известен также способ по патенту US 6936459 B1, опубликованный 30.08.2005 по индексам МПК A01G-031/00, A01G-033/00, C07C-403/24, C12N-001/12, C12R-001/89, в котором направленное культивирование одноклеточной водоросли *Dunaliella salina ARL5* проводится в условиях высокой концентрации солей на новой питательной среде с дополнительным добавлением KCl (в качестве главного усилителя солености среды) к известной смеси солей NaCl и MgSO₄. Сообщается, что добавление KCl значительно увеличивает прирост биомассы микроводоросли, а также стимулирует накопление β -каротина, его изомеров и других каротиноидов. Недостатком данного способа является узкий диапазон применения этого способа получения биомассы, поскольку он подходит лишь для микроводорослей устойчивых к высоким концентрациям KCl.

Наиболее близким техническим решением, выбранным в качестве прототипа, является технология использования добавок перекиси водорода с целью направленного вторичного каротиногенеза в клетках микроводоросли *Ettlia carotinosa* авторов: Э.С. Челебиевой, Г.С. Минюк и др. [5]. Технология получения биомассы, описанная авторами, включает использование гидропероксида водорода в смеси с сульфатом железа (II) (10^{-4} мМ и 0.45 мМ) для увеличения скорости накопления каротиноидов на единицу объема клетки. Недостатком этой технологии является значительное уменьшение размера клеток микроводорослей. При этом содержание каротиноидов увеличивается относительно единицы объема клетки, но не приводит к увеличению содержания каротиноидов в полученной биомассе. Другим недостатком этой технологии является

использование ионов Fe^{2+} , известного своей способностью инициировать реакции перекисного окисления липидов (реакции Фентона) в присутствии перекиси водорода, что может вызывать гибель клеток микроводорослей.

Технической проблемой, решаемой представляемым способом является получение биомассы микроводорослей с повышенным содержанием каротиноидов путем направленного культивирования вида *Chlorella sorokiniana*.

Технический результат заявляемого изобретения достигается тем, что для направленного культивирования используют микроводоросль *Chlorella sorokiniana*, в котором маточную культуру микроводорослей *Chlorella sorokiniana* предварительно готовят в виде клеточной суспензии, которую помещают в фотобиореактор (ФБР), проводят аэрацию клеточной суспензии, соблюдая температурный режим и освещают в режиме «день/ночь», при этом аэрацию проводят в режиме 1,3-1,7 л/мин, поддерживают температуру культивирования 21-24°C, освещение проводят световым потоком 2800-3200 лм в режиме 12 часов в сутки «день», 12 часов в сутки «ночь», в составе базовой питательной среды используют смесь добавок 3% перекиси водорода и пиридоксина в соотношении 0,1-0,3 мл и 6-16 мл на 10 л питательной среды соответственно.

Техническим результатом заявляемого изобретения является повышение содержания каротиноидов в сухой биомассе микроводоросли *Chlorella sorokiniana* путем направленного культивирования, которое проводят в подобранном режиме.

Применение добавок 3% перекиси водорода вызывает окислительный стресс клеток микроводорослей. Ответной реакцией клеток на окислительный стресс является биосинтез светоулавливающих пигментно-белковых комплексов. Пиридоксин значительно повышает активность протекторных антиоксидантных ферментов у *Chlorella vulgaris*, в том числе, пероксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы и аскорбатпероксидазы. Поэтому сочетанное применение добавок перекиси водорода и пиридоксина повышает эффективность процессов биосинтеза каротиноидов в микроводоросли *Chlorella sorokiniana*, не вызывая при этом нежелательных последствий окислительного стресса.

Совокупность перечисленных выше существенных признаков приводит к увеличению содержания каротиноидов в получаемой сухой биомассе микроводорослей.

Краткое описание иллюстраций.

На прилагаемых к описанию иллюстрациях дано:

Фиг. 1 - лабораторный фотобиореактор, включающий:

1 - камера; 2 - трубы насоса-аэратора; 3 - панельные светодиодные лампы; 4 - насос-аэратор; 5 - слив биомассы.

Фиг. 2 - влияние вносимых добавок перекиси водорода и пиридоксина на выход воздушно-сухой биомассы *Chlorella sorokiniana*:

а) - контрольный образец (без добавок), б) - образец с добавками перекиси водорода и пиридоксина.

Фиг. 3 - спектры поглощения экстракта каротиноидов из биомассы *Chlorella sorokiniana*, полученной с использованием добавок перекиси водорода и пиридоксина.

Фиг. 4 - влияние вносимых добавок перекиси водорода и пиридоксина на содержание каротиноидов в образцах биомассы *Chlorella sorokiniana*:

в) - контрольный образец (без добавок), г) - образец с добавками перекиси водорода и пиридоксина.

Заявляемый способ получения биомассы с высоким содержанием каротиноидов реализуется с помощью ФБР по Фиг. 1. Внутреннюю поверхность корпуса - 1 ФБР обрабатывают 3% раствором перекиси водорода и затем промывают водой до

нейтрального значения рН промывных вод. Трубки - 2 насосов - аэраторов продувают воздухом от лишней влаги внутри.

В качестве источника освещения ФБР используют панельные светодиодные лампы - 3 из 5 рядов светодиодной ленты (световой поток 2800-3200 лм, Т(К) 4000), площадью около 0,2 м², которые находятся в рабочем состоянии 12 ч. в сутки (режиме «день/ночь»). Лампы - 3 располагают с обеих лицевых сторон ФБР для равномерного освещения всего объема биомассы.

Подготовка питательной среды. Питательную среду для культивирования микроводорослей готовят на основе воды. Для приготовления маточных сред А и В (Табл. 1) взвешивают необходимое количество солей и растворяют в воде комнатной температуры в мерной емкости объемом 1 л. После полного растворения солей необходимый объем маточной среды переносят в ФБР. Взвешивают остальные соли (макроэлементы) и вносят в ФБР, после чего общий объем питательной среды доводят до 10 л.

Таблица 1 - Состав базовой питательной среды для культивирования микроводорослей *Chlorella sorokiniana* [6].

20

25

30

35

40

45

Маточная среда А (микроэлементы)				
Вещество	Молекулярная масса, г/моль	Концентрация в маточном растворе, мг/л	Концентрация в культуральной среде, мкг/л	Расход, мл/на 1 л3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287,53	0,1	100	10
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249,66	0,1	10	0,1
CoSO ₄ ·7H ₂ O	281,06	0,1	100	5
MnCl ₂ ·4H ₂ O	197,91	0,1	500	5
H ₃ BO ₃	61,83	0,1	50	0,5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241,96	0,1	100	0,1
Маточная среда В (микроэлементы)				
Вещество	Молекулярная масса, г/моль	Концентрация в маточном растворе, мг/л	Концентрация в культуральной среде, мкг/л	Расход, мл/на 1 л
FeCl ₃ ·6H ₂ O	270,21	1	4	4
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	372,24	1	6	6
Макроэлементы				
Вещество	Молекулярная масса, г/моль	Концентрация в маточном растворе, мг/л	Расход, г/на 1 л	
KNO ₃	101,1	1	3,26	
KH ₂ PO ₄	136,07	100	0,32	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,48	240	2,46	

Взвешивают необходимое количество перекиси водорода и пиридоксина и вносят непосредственно в ФБР 1 раз в сутки.

Подготовка маточной культуры микроводорослей. Маточную культуру микроводорослей *Chlorella sorokiniana* хранят в холодильнике в закрытой посуде из темного стекла при температуре (4±2) °С. Перед началом культивирования пре-культуру

извлекают из холодильника и отепляют до комнатной температуры, после чего необходимое количество маточной культуры вносят в подготовленный ФБР, так чтобы исходное количество клеток в ФБР составляло 8,0-8,5 млн клеток на 1 мл.

Культивирование осуществляют при постоянной аэрации воздухом с помощью

5 насоса-аэратора - 4 в режиме 1,3-1,7 л/мин.

Температуру среды поддерживают в диапазоне 21-24°C (при повышении температуры выше указанного диапазона в ФБР вносят необходимое количество питательной среды). Осуществляют мониторинг температуры питательной среды.

Один раз в сутки перемешивание питательной среды осуществляют с помощью

10 механической мешалки в течение 15 мин. при 500 об/мин, для предотвращения образования застойных зон.

Ежедневно контролируют оптическую плотность для определения концентрации супензии микроводорослей и осуществляют контроль pH.

После окончания цикла культивирования (4 суток) прекращают аэрацию смеси и

15 оставляют супензию для отстаивания на 1 сутки, после чего через нижнее сливное отверстие - 5 в корпусе - 1 ФБР около 9 л супензии сливают, оставляя в ФБР около 1 л для запуска нового цикла культивирования.

После окончания 5 циклов ФБР полностью освобождают от супензии микроводорослей, промывают 3% раствором перекиси водорода и затем ополаскивают 20 водой. Промывание осуществляют большим количеством воды.

Пример 1.

В качестве примера можно рассмотреть вариант увеличения количества каротиноидов при следующем режиме культивирования.

Для направленного культивирования использовалась микроводоросль *Chlorella*

25 *sorokiniana*. Процесс культивирования проводился на основе маточной культуры микроводорослей *Chlorella sorokiniana* (штамм 211-8k) из коллекции водорослей университета Геттингена (Culture Collection of Algae at *Göttingen* University, international acronym SAG) в питательной среде, содержащей макро- и микроэлементы, состав приведен в Табл. 1.

30 Температуру среды для культивирования поддерживают равной 21°C, аэрацию воздухом проводят с помощью насоса-аэратора - 2 в режиме 1,3 л/мин, режим освещенности - 2800 лм.

Вводят необходимое количество 3% перекиси водорода, а именно 0,1 мл и пиридоксина 6 мл на 10 л питательной среды. Данные условия позволяют получить 35 биомассу с содержанием каротиноидов 5,3 мг/мл.

Пример 2.

Направленное культивирование проводилось в тех же условиях, что и в Примере 1, с отличиями в том, что температура среды поддерживается равной 24°C, аэрацию воздухом проводят с помощью насоса-аэратора - 4 в режиме 1,7 л/мин, режим освещенности - 3200 лм.

40 Количество перекиси водорода, вносимого в питательную среду, составило 0,3 мл и пиридоксина 16 мл на 10 л питательной среды. Данные условия позволяют получить биомассу с содержанием каротиноидов 6,6 мг/мл.

Установлено, что использование смеси добавок перекиси водорода и пиридоксина

45 в предлагаемом способе культивирования микроводорослей позволяет увеличивать содержание каротиноидов в полученной биомассе до 1,8 раза относительно контрольного образца биомассы, полученного без использования добавок перекиси водорода и пиридоксина.

Увеличение содержания каротиноидов в полученной биомассе индуцируется путем применения добавок перекиси водорода [8-9], что вызывает окислительный стресс клеток микроводорослей. Ответной реакцией клеток на окислительный стресс является биосинтез светоулавливающих пигментно-белковых комплексов [10]. Известно, что 5 пиридоксин способен стимулировать пластический обмен и нивелировать процессы оксидативного стресса.

Таким образом, заявляемый способ направленного культивирования микроводоросли *Chlorella sorokiniana* позволяет получить биомассу с содержанием каротиноидов от 5,3 до 7 мг на 1 г сухой биомассы.

10 Список литературы:

1. Solovchenko A.E. Physiology and Adaptive Significance of Secondary Carotenogenesis in Green Microalga // Russian Journal of Plant Physiology: Biology, Moscow. - 2013. - Vol. 60, no. 1. - P. 1-13. DOI: 10.1134/S1021443713010081
2. Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Каротиноиды как основа для создания 15 лечебно-профилактических средств // Российский биотерапевтический журнал. - 2009. - Т. 8, №4. - С. 91-98.
3. Смятская Ю.А. Биотехнология создания из биомассы микроводорослей хлорелла и хитозана кормовой добавки // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология. 2020. - №3. 20 - С. 7-19
4. Влияние питательной среды и интенсивности барботажа на динамику физиологических параметров роста хлореллы», Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук. 2016. №2
5. Физиолого-биохимические характеристики микроводоросли *Ettlia Carotinosa* 25 *Komárek* 1989 (Chlorophyceae) в условиях экспериментального стресса / Э.С. Челебиева, Г.С. Минюк, И.В. Дробецкая, И.Н. Чубчикова. - 2-е изд. - Севастополь: Морський Екологічний журнал, 2013. - С. 78-87
6. Crofcheck C.A. Shea, Montross M., Crocker M, Andrews R. Influence of media composition on the growth rate of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* utilized for CO₂ mitigation // 30 J. Biochem.Tech. - 2012. - 4(2) - P. 589-594
7. Кузнецова Т.А., Никитина М.С., Севастьянова А.Д. Направленное культивирование *Chlorella sorokiniana* с целью увеличения синтеза каротиноидов // Вестник ВГУИТ. Пищевая биотехнология. - 2019. - №4. - С. 34-39. DOI: 10.20914/2310-1202-2019-4-34-39
8. Физиолого-биохимические характеристики микроводоросли *Ettlia Carotinosa* 35 *Komárek* 1989 (Chlorophyceae) в условиях экспериментального стресса / Э.С. Челебиева, Г.С. Минюк, И.В. Дробецкая, И.Н. Чубчикова. - 2-е изд. - Севастополь: Морський Екологічний журнал, 2013. - С. 78-87
9. Solovchenko, A.E. Physiology and Adaptive Significance of Secondary Carotenogenesis in Green Microalga. Russian Journal of Plant Physiology, Moscow, 2013, vol. 60, no. 1, pp. 1-13. 40 DOI: 10.1134/S1021443713010081
10. Дымова О.В., Головко Т.К. Фотосинтетические пигменты: функционирование, экология, биологическая активность // Известия Уфимского научного центра РАН. - 2018. - №3. - С. 5-16.

45 (57) Формула изобретения

1. Способ направленного культивирования микроводоросли *Chlorella sorokiniana*, в котором маточную культуру микроводорослей *Chlorella sorokiniana* предварительно готовят в виде клеточной суспензии, которую помещают в фотобиореактор, проводят

аэрацию клеточной суспензии, соблюдая температурный режим, и освещают в режиме «день/ночь», при этом базовая питательная среда содержит перекись водорода, при этом аэрацию проводят в режиме 1,3-1,7 л/мин, поддерживают температуру культивирования 21–24°C, освещение проводят световым потоком 2800-3200 лм в

⁵ режиме 12 часов в сутки «день», 12 часов в сутки «ночь», в составе базовой питательной среды используют смесь добавок 3% перекиси водорода и пиридоксина в соотношении 0,1-0,3 мл и 6-16 мл на 10л питательной среды соответственно.

2. Способ по п. 1, в котором в качестве источника освещения используют панельные светодиодные лампы с цветовой температурой T(K) 4000.

¹⁰

¹⁵

²⁰

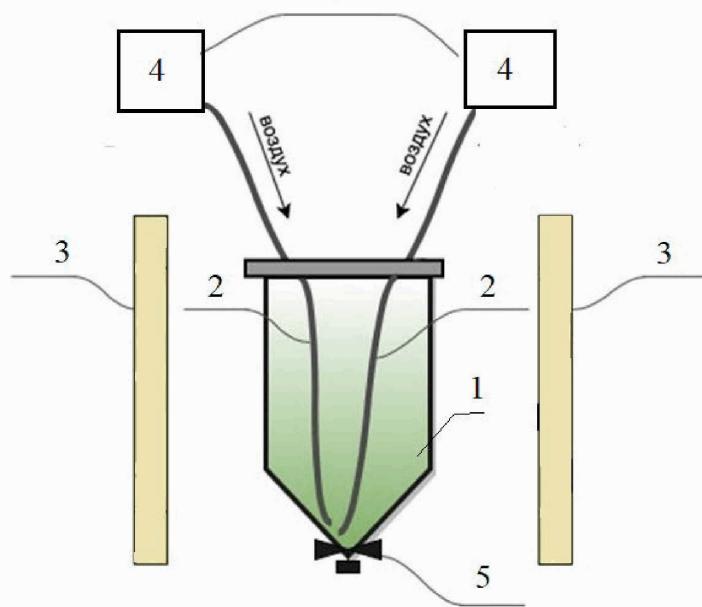
²⁵

³⁰

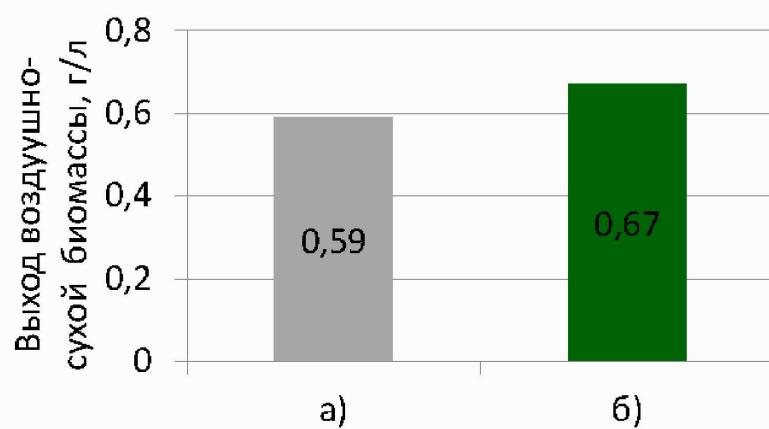
³⁵

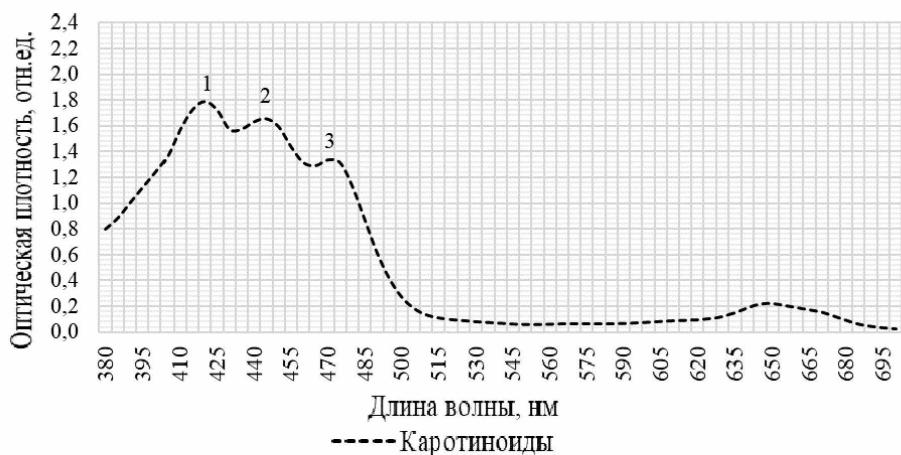
⁴⁰

⁴⁵

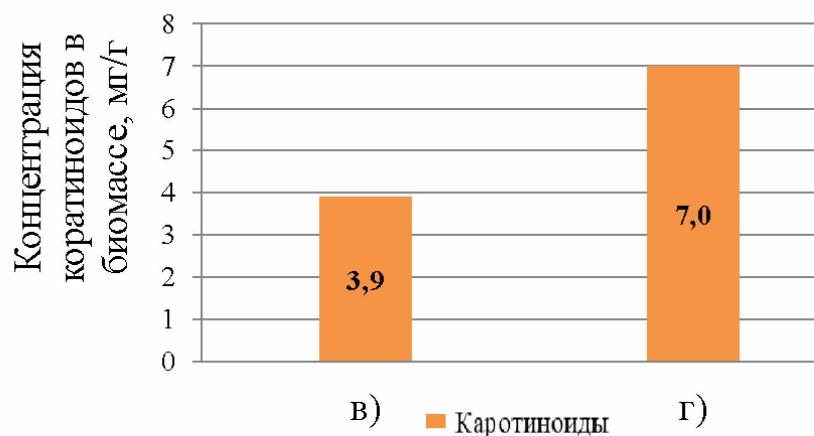


Фиг.1. - лабораторный фотобиореактор

Фиг.2 - влияние вносимых добавок перекиси водорода и пиридоксина на выход воздушно-сухой биомассы *Chlorella sorokiniana*



Фиг.3 - спектры поглощения экстракта каротиноидов из биомассы *Chlorella sorokiniana*, полученной с использованием добавок перекиси водорода и пиридоксина.



Фиг.4 - влияние вносимых добавок перекиси водорода и пиридоксина на содержание каротиноидов в образцах биомассы *Chlorella sorokiniana*