



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:  
06.04.2021

Дата 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 Исмаил 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* Kom&  
aacute;rek 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..



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:  
**06.04.2021**

Registration 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. Politekhnikeskaya,  
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  
politekhnikeskii universitet Petra Velikogo"  
(FGAOU VO "SPbPU") (RU)**

(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*.

5 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 -  $\alpha$ - и  $\beta$ -каротина, фукосантина, 10 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 15 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 20 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. Дмитриевич, А.С. Крыльчук и Н.А. Симончик [4]. Данное техническое решение предполагает культивирование микроводоросли на питательных средах с пониженным 25 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 30 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 MgSO<sub>4</sub>. Сообщается, что добавление KCl значительно 35 увеличивает прирост биомассы микроводоросли, а также стимулирует накопление  $\beta$ -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 40 вторичного каротиногенеза в клетках микроводоросли *Ettlia carotinos* 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 45 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  $\text{Fe}^{2+}$ , 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 - трубки 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 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 pH 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, T(K) 4000), площадью около 0,2 м<sup>2</sup>, 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].

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 <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287,53	0,1	100	10
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249,66	0,1	10	0,1
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	281,06	0,1	100	5
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	197,91	0,1	500	5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,83	0,1	50	0,5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> 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 <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	270,21	1	4	4
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	372,24	1	6	6
Макроэлементы				
Вещество	Молекулярная масса, г/моль	Концентрация в маточном растворе, мг/л	Расход, г/на 1 л	
KNO <sub>3</sub>	101,1	1	3,26	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,07	100	0,32	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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.

5 Культивирование осуществляют при постоянной аэрации воздухом с помощью 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.

10 Один раз в сутки перемешивание питательной среды осуществляют с помощью механической мешалки в течение 15 мин. при 500 об/мин, для предотвращения образования застойных зон.

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

15 После окончания цикла культивирования (4 суток) прекращают аэрацию смеси и оставляют суспензию для отстаивания на 1 сутки, после чего через нижнее сливное отверстие - 5 в корпусе - 1 ФБР около 9 л суспензии сливают, оставляя в ФБР около 1 л для запуска нового цикла культивирования.

После окончания 5 циклов ФБР полностью освобождают от суспензии 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.

25 Для направленного культивирования использовалась микроводоросль *Chlorella 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 acropum 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.

40 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.

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.

45 Установлено, что использование смесидобавок перекиси водорода и пиридоксина 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 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.

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 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. - 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 Carotinos* 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 // 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 Carotinos* 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. DOI: 10.1134/S1021443713010081

10. Дымова О.В., Головкин Т.К. Фотосинтетические пигменты: функционирование, экология, биологическая активность // Известия Уфимского научного центра РАН. - 2018. - №3. - С. 5-16.

#### (57) Формула изобретения

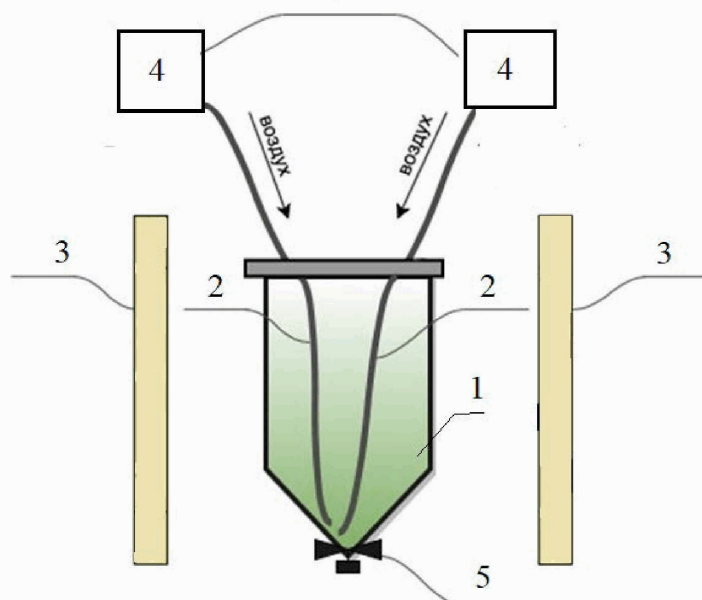
1. Способ направленного культивирования микроводоросли *Chlorella sorokiniana*, в котором маточную культуру микроводорослей *Chlorella sorokiniana* предварительно готовят в виде клеточной суспензии, которую помещают в фотобиореактор, проводят



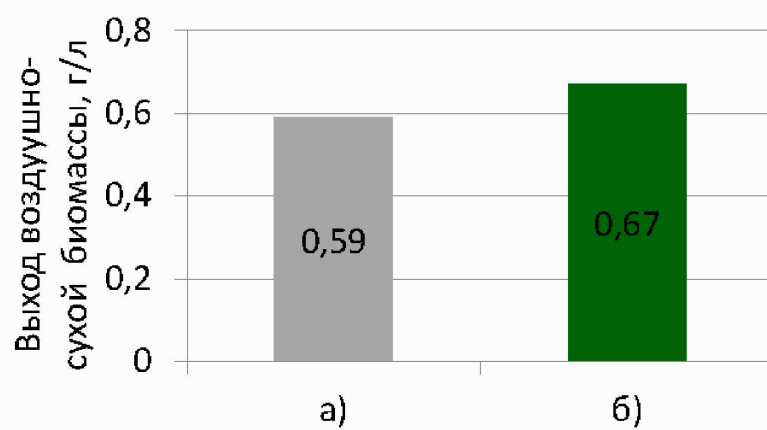
аэрацию клеточной суспензии, соблюдая температурный режим, и освещают в режиме «день/ночь», при этом базовая питательная среда содержит перекись водорода, при этом аэрацию проводят в режиме 1,3-1,7 л/мин, поддерживают температуру культивирования 21–24°C, освещение проводят световым потоком 2800-3200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

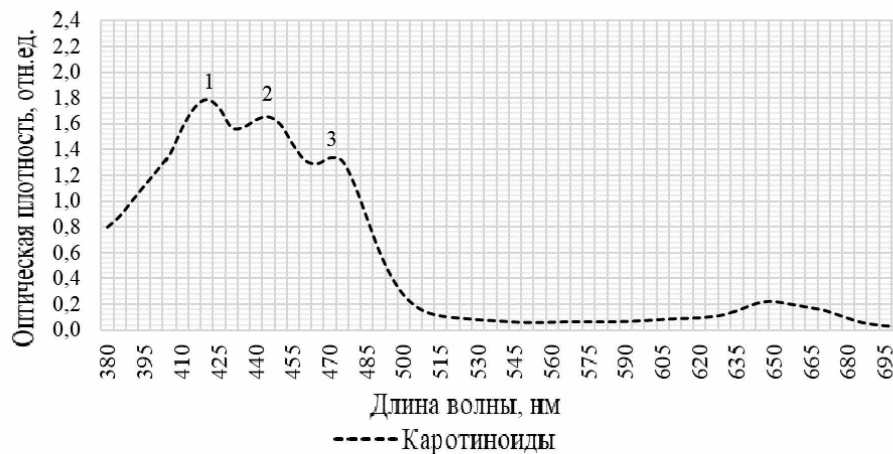
1



Фиг.1. - лабораторный фотобиореактор

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

2



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*