



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A01G 33/00 (2021.08); C12N 1/12 (2021.08); C12M 1/02 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2021114100, 18.05.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.05.2021

Дата регистрации:
28.03.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.05.2021

(45) Опубликовано: 28.03.2022 Бюл. № 10

Адрес для переписки:

305021, г. Курск, ул. К. Маркса, 70б, Курский
ФАНЦ

(72) Автор(ы):

Свазлян Гаяне Агасовна (RU),
Наумов Николай Михайлович (RU),
Королева Александра Юрьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Курский федеральный
аграрный научный центр" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2668162 C1, 26.09.2018. SU
1711734 A1, 15.02.1992. НАГОРНОВ С.А.,
МЕЩЕРЯКОВА Ю.В. Исследование условий
культивирования микроводоросли хлорелла
в трубчатом фотобиореакторе // Вестник
ТГТУ. - 2015. - Т. 21. - N 4. - С. 653-658; ЕА
017614 В1, 30.01.2013. US 2013102076 A1,
25.04.2013.

(54) Способ культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris*

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способам искусственного культивирования микроводоросли вида *Chlorella vulgaris*. Способ культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris* включает выращивание микроводоросли в фотобиореакторе на питательной среде с аэрацией и перемешиванием слоев при искусственном освещении. Микроводоросли выращивают в фотобиореакторе с клинообразным дном, на питательной среде Тамия с добавлением 0,01% АСД Ф-2, при постоянной аэрации и перемешивании суспензии с помощью аквариумной помпы и компрессора с одновременной подачей углекислого газа 0,05 л/мин, при температуре 30°C и непрерывном освещении люминесцентными лампами 5000 Лк. Фотобиореактор для выращивания

микроводорослей имеет прямоугольное поперечное сечение, расстояние между большими стенками равно 10 см. Клинообразное дно имеет восходящую и нисходящую части, угол между которыми, а также углы между каждой частью и прилегающей вертикальной стенкой, равны 120°. Длина рабочей вертикальной стенки, сопряженной с нисходящей частью дна, равна L, проекция нисходящей части дна на горизонтальное основание равна 2/3 L, а проекция восходящей части дна на горизонтальное основание равна 1/3 L. Такое строение дна улучшает перемешивание суспензии микроводорослей. Технический результат - увеличение прироста биомассы и сохранение требуемого качества при минимальных сроках и энергетических затратах, а также простота и доступность способа. 1 з.п. ф-лы, 1 ил., 6 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A01G 33/00 (2021.08); C12N 1/12 (2021.08); C12M 1/02 (2021.08)(21)(22) Application: **2021114100, 18.05.2021**(24) Effective date for property rights:
18.05.2021Registration date:
28.03.2022

Priority:

(22) Date of filing: **18.05.2021**(45) Date of publication: **28.03.2022** Bull. № 10

Mail address:

**305021, g. Kursk, ul. K. Marksa, 70b, Kurskij
FANTS**

(72) Inventor(s):

**Svazlyan Gayane Agasovna (RU),
Naumov Nikolaj Mikhajlovich (RU),
Koroleva Aleksandra Yurevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
nauchnoe uchrezhdenie "Kurskij federalnyj
agrarnyj nauchnyj tsentr" (RU)**(54) **METHOD FOR CULTIVATION OF MICROALGAE CHLORELLA VULGARIS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, in particular to methods for artificial cultivation of microalgae of the species *Chlorella vulgaris*. The method for cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* involves growing microalgae in a photobioreactor on a nutrient medium with aeration and mixing of layers under artificial lighting. Microalgae are grown in a photobioreactor with a wedge-shaped bottom, on a Tamiya nutrient medium with the addition of 0.01% ASD F-2 preparation, with constant aeration and stirring of the suspension using an aquarium pump and a compressor with simultaneous supply of 0.05 l/min carbon dioxide, at a temperature of 30°C and continuous illumination with 5000 Lux fluorescent lamps. The photobioreactor for growing microalgae has

a rectangular cross-section, the distance between the large walls is 10 cm. The wedge-shaped bottom has ascending and descending parts, the angle between which, as well as the angles between each part and the adjacent vertical wall, are equal to 120°. The length of the working vertical wall connected to the descending part of the bottom is L, the projection of the descending part of the bottom on the horizontal base is 2/3 L, and the projection of the ascending part of the bottom on the horizontal base is 1/3 L. This bottom structure improves the mixing of the microalgae suspension.

EFFECT: increase in the growth of biomass and the preservation of the required quality with minimal time and energy costs, as well as the simplicity and accessibility of the method.

2 cl, 1 dwg, 6 tbl

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способам искусственного культивирования микроводоросли вида *Chlorella vulgaris*.

Микроводоросль *Chlorella vulgaris* широко применяется как в медицине, так и в животноводстве в качестве биологически активной кормовой добавки, а также в пищевой промышленности. На основе микроводоросли *Chlorella* возможно создание биосорбентов для очистки воды, а также микроводоросль может быть источником биотоплива.

Известен способ (патент РФ №2508398, опубл. 27.02.2014, МПК C12N 1/12, C12P 7/64, C12R 1/89), в котором культивирование штамма микроводоросли *Chlorella vulgaris* AI 123 проводят в лабораторных условиях при температуре 25°C на среде BBM pH 6.8 в лимитированных по азоту условиях в течение 7 дней, в объеме среды 200 мл в колбах на 500 мл, при непрерывном барботировании суспензии стерильным воздухом со скоростью 200 мл/мин, при освещенности 120 Вт/м² с фотопериодом 16 ч. Недостатком данного способа является низкий прирост биомассы.

Известен способ культивирования микроводоросли *Chlorella*, который предусматривает культивирование микроводоросли на жидкой питательной среде в условиях перемешивания и освещения при воздействии импульсного низкочастотного электромагнитного поля с магнитной индукцией 2000 Гс при частоте импульсов 10 Гц и длительностью 10 мкс (авт. св. №1711734, опубл. 15.02.1992, МПК A01G 33/00, C12N 13/00). К недостаткам данного способа можно отнести низкую производительность и высокую энергозатратность.

Известен способ искусственного культивирования микроводорослей и установка для его осуществления (патент РФ №2175013, опубл. 10.06.2001, МПК C12N 1/12, A01G 33/00). Культивирование микроводорослей осуществляется путем фотосинтеза при воздействии на них радиолюминесцентного излучения и тепла, возбуждаемого проникающими ядерными излучениями, при этом спектр радиолюминесцентного излучения может быть выбран резонансно совпадающим со спектром действия фотосинтеза. Искусственным источником энергии служит источник проникающих ядерных излучений, источником люминесцентного оптического излучения - радиолуминофор, тепло генерируется в среде источника ядерных излучений. В качестве источника ядерных излучений используется ядерный реактор, в том числе, реактор-размножитель с уран-ториевым циклом в виде решетки из ядерных радиолюминесцентных ламп, которые со всех сторон окружены светоприемными кюветами с суспензией культивируемых микроводорослей. Недостатками способа являются высокие энергозатраты, использование ядерного излучения, применение дорогостоящего компонента, являющегося прекурсором, радиолуминофора.

Наиболее близким аналогом является способ искусственного культивирования микроводорослей и установка для его осуществления (патент РФ №2668162, опубл. 26.09.2018, МПК C12N 1/12, A01G 33/00, C12M 1/02, C12M 1/36). Способ включает культивирование суспензии микроводоросли в фотобиореакторе, в котором суспензию микроводоросли перемешивают в течение 13-17 минут с частотой вращения 500 об/мин через каждые 120 минут. При этом культивирование осуществляют также барботирующего устройства с расходом 1,2-1,8 л/мин при температуре 26-30°C, непрерывном воздействии инфракрасного излучения 10900-11300 Лк и при поверхностной освещенности 2200-2800 Лк с фотопериодом 12 часов. Недостатком способа по прототипу является трудоемкость культивирования.

Технической задачей заявляемого изобретения является разработка высокопроизводительного, экологически чистого, безопасного способа с использованием нетрудоемких операций и минимально энергозатратной компактной

установки для искусственного культивирования микроводорослей вида *Chlorella vulgaris* в лабораторных условиях.

Технический результат - увеличение прироста биомассы и сохранение требуемого качества, при минимальных сроках и энергетических затратах, а также простоте и доступности способа.

Технический результат достигается за счет культивирования суспензии микроводоросли *Chlorella vulgaris* в фотобиореакторе с клинообразным дном, при:

интенсивности освещения 5000 Лк;

перемешивании и аэрации суспензии с помощью аквариумной помпы;

оптимизации питательной среды - использование питательной среды Тамия с 0,01% АСДФ-2;

подаче углекислого газа с интенсивностью 0,05 л/мин.

Новые существенные признаки:

1. Для культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris* изготовлены

фотобиореакторы с прямоугольным поперечным сечением, расстоянием между большими боковыми стенками 10 см и клинообразным дном, у которых углы между вертикальной стенкой и нисходящей частью дна, между нисходящей и восходящей частями дна и восходящей и вертикальной стенкой равны 120°; при этом длина рабочей вертикальной стенки, сопряженной с нисходящей частью дна, равна L, проекция нисходящей части дна на горизонтальное основание фотобиореактора равна 2/3 L, а проекция восходящей части дна на горизонтальное основание равна 1/3 L (фиг.). Экспериментально определено, что данная форма фотобиореактора обеспечивает более легкое перемешивание суспензии микроводорослей и снижает их осаждаемость.

Для освещения были использованы люминесцентные лампы, спектр которых благоприятно воздействует на рост микроводорослей. Расстояние между большими стенками обеспечивает толщину столба суспензии микроводоросли 10 см, превышение которой ухудшает его проницаемость для светового потока и, соответственно, рост и развитие микроводорослей.

2. В лабораторных исследованиях определялось влияние трех различных вариантов перемешивания и аэрации на скорость роста микроводорослей *Chlorella*, при остальных равных факторах: базовая питательная среда Тамия, состав которой указан в таблицах 1 и 2, освещение 5000 Лк, температура 30°C. В первом фотобиореакторе перемешивание осуществлялось с помощью аквариумной помпы и аэрацией компрессором. Во втором фотобиореакторе перемешивание осуществлялось путем аэрации через стеклянную трубку с распылителем на конце (мелкие пузырьки воздуха увлекают за собой жидкость и благодаря форме фотобиореактора обеспечивается ее круговое вертикальное перемешивание). В третьем фотобиореакторе перемешивание осуществлялось по тому же принципу, что и во втором, только на конце стеклянной трубки отсутствовал распылитель, что обеспечивало активное перемешивание, но за счет крупного размера пузырей воздуха аэрация была менее эффективной. Результаты исследования приведены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, для максимальной интенсивности роста микроводорослей наиболее эффективен вариант аэрации и перемешивания аквариумной помпой и компрессором, где на 5-е сутки количество клеток в 1 мл суспензии составляло $34,50 \cdot 10^7$, по сравнению с вариантом 2 - $7,5 \cdot 10^7$ и вариантом 3 - $9,00 \cdot 10^7$

3. Оптимизация питательной среды. Определялось влияние различных вариантов питательной среды на скорость роста микроводорослей *Chlorella*, при остальных равных факторах (перемешивание и аэрация с помощью аквариумной помпы и компрессора,

освещение люминесцентными лампами 5000 Лк, температура 30°C).

В первом фотобиореакторе использовалась питательная среда Тамия. (базовый вариант, указанный в паспорте *Chlorella vulgaris* штамма С-1, таблицы 1, 2). Во втором фотобиореакторе водоросли выращивались в дистиллированной воде. В третьем фотобиореакторе использовалась среда на основе витаминно-минерального комплекса «Компливит» (табл. 4).

Для использования витаминно-минерального комплекса «Компливит» в качестве питательной среды, сначала готовили концентрированный раствор из расчета одна таблетка на 1 л дистиллированной воды. Затем полученный раствор биологически активных веществ смешивали с дистиллированной водой из расчета 1 мл раствора на 1 л воды, получая нужный объем питательной среды.

В четвертом фотобиореакторе использовалась питательная среда Тамия (базовый вариант) с добавлением 0,01% АСДФ-2.

Низкомолекулярные компоненты данной фракции по своей структуре родственны продуктам клеточного обмена, что облегчает их вовлечение в метаболический процесс. Добавление АСДФ-2 в среду Тамия обосновывали тем, что вторая фракция имеет в своем составе низшие карбоновые кислоты, их аммонийные соли, амиды и холиновые эфиры, разнообразные производные аммиака и солей аммония, холина, метилмеркаптана и других веществ с SH-группами. Компоненты АСДФ-2 способны оказать ростстимулирующее действие, обогатить питательную среду азотом, корректировать рН. Антисептическое действие АСДФ-2, обусловленное высоким рН, не окажет губительного действия на микроводоросли в силу высокого разведения и значительной толерантности микроводоросли *Chlorella* к щелочной среде.

Из таблицы 5 видно, что выше скорость роста была в третьем (среда на основе витаминно-минерального комплекса «Компливит») и четвертом фотобиореакторах (питательная среда Тамия с добавлением 0,01% АСДФ-2).

Во втором и первом фотобиореакторах результаты до 4 дня были сравнимы между собой, на пятый день в дистиллированной воде интенсивность роста микроводоросли значительно снизилась, что обусловлено недостатком питательных веществ.

4. Известно, что количество углекислоты в процессе культивирования микроводорослей является одним из лимитирующих факторов.

С целью повышения интенсивности роста и качества биомассы в лабораторных условиях было включено в технологию выращивания микроводоросли *Chlorella vulgaris* обогащение суспензии углекислым газом. Были проведены исследования влияния количества углекислого газа на интенсивность роста микроводоросли при остальных равных факторах (перемешивание и аэрация с помощью аквариумной помпы и компрессора, освещение люминесцентными лампами 5000 Лк, температура 30°C, базовая питательная среда Тамия с добавлением 0,01% АСДФ-2).

С помощью стеклянной трубки с распылителем на конце, погруженным в самую нижнюю точку фотобиореактора, осуществляли подачу CO₂ в трех вариантах:

- в первом фотобиореакторе 0,05 л/мин;
- во втором фотобиореакторе 0,1 л/мин;
- в третьем фотобиореакторе 0,5 л/мин;

Критерии оценки были такие же, как и в предыдущем эксперименте: Результаты исследования приведены в таблице 6.

Из таблицы 6 видно, что существенной разницы между первым и вторым вариантом не наблюдается. В третьем варианте интенсивность роста с третьего дня отсутствовала, а цвет изменился с зеленого на бело-желтый, что свидетельствует о гибели клеток из-

за избыточного количества углекислоты.

Таким образом, первый вариант с минимальным количеством углекислого газа, 0,05 л/мин является оптимальный при данной технологии выращивания.

Пример осуществления способа.

5 Перед началом культивирования 5-литровый фотобиореактор дезинфицируют 10% NaOH, промывают дистиллированной водой, устанавливают аквариумную помпу и трубку с распылителем для подачи CO₂, заполняют готовой питательной средой Тамия с добавлением 0,01% АСД Ф-2 в объеме 4,75 л, комнатной температуры, после чего
10 добавляют 250 мл инокулята микроводоросли *Chlorella vulgaris* плотностью 3×10^8 клеток/мл. Освещение производят люминесцентными лампами, располагая фотобиореакторы на таком расстоянии от ламп, чтобы обеспечить освещенность в 5000 Лк. Подачу углекислого газа устанавливают в объеме 0,05 л/мин. Температура суспензии поднимается и поддерживается на уровне 30°C за счет теплового излучения люминесцентных ламп.

15 В процессе культивирования на третьи сутки плотность суспензии составит $4,1 \times 10^8$ клеток/мл, на пятые сутки $4,5 \times 10^8$. Клетки микроводоросли крупные, не слипшиеся, недеформированные, суспензия насыщенного зеленого цвета, что свидетельствует о высоком качестве биомассы. В это время производится отбор готовой суспензии
20 микроводорослей в объеме 4,75 л с замещением равным объемом питательной среды, и процесс культивирования продолжается. Данный способ позволяет проводить до 5 циклов непрерывного культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris*, после чего производится чистка и дезинфекция фотобиореактора.

25 Готовая суспензия является ценным биологическим сырьем и может использоваться в чистом виде или как компонент биологически активных добавок в питании человека и кормлении сельскохозяйственных животных. Хранить готовую суспензию необходимо при температуре 15°C и без доступа прямых солнечных лучей.

30 Таблица 1.- Состав модифицированной базовой питательной среды Тамия. в расчете на 1 л готового раствор

Наименование компонента	Количество, г
KNO ₃	5,0
MgSO ₄ ×7H ₂ O	2,5
KH ₂ PO ₄	1,25
ЭДТА	0,037
FeSO ₄ ×7H ₂ O*	0,009
раствор микроэлементов (из табл. 2)	1 мл

Таблица 2. - Пропись для раствора микроэлементов (в г/л):

Наименование компонента	Количество
H_3BO_3	2,86
$MnCl_2 \times 4H_2O$	1,81
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	0,222
MoO_3	0,018
NH_4VO	0,023

Таблица 3. Влияние аэрации и перемешивания на интенсивность роста микроводорослей хлорелла

Фотобио-реактор	Сутки	Цвет	Осадок/пена	Посторонние микр.	Количество клеток $\times 10^7$
1	1	Св. салатовый	Нет/нет	Нет	1,50
	2	Св. зеленый	Нет/нет	Нет	3,50
	3	Зеленый	Нет/нет	Нет	7,50
	4	Т. зеленый	Нет/нет	Нет	20,00
	5	Т. зел. (свет не проходит)	Нет/нет	Нет	34,50
2	1	Св. салатовый	Нет/нет	Нет	1,50
	2	Св. салатовый	Незнач./нет	Нет	2,50
	3	Св. зеленый	Есть/нет	Нет	3,50
	4	Зеленый	Есть/нет	Нет	6,00
	5	Зеленый	Есть/нет	Нет	7,50
3	1	Св. салатовый	Нет/нет	Нет	1,50
	2	Св. зеленый	Незнач./есть	Нет	3,00
	3	Зеленый	Незнач./есть	Нет	6,00
	4	Зеленый	Есть/есть	Нет	7,50
	5	Зеленый	Есть/есть	Нет	9,00

Таблица 4.- Состав таблетки «Компливит»

5	ретинола ацетат 1,135 мг	фосфор 60 мг
	альфа-токоферола ацетат 10 мг	железо 5мг
	тиамина хлорид 1 мг	медь 0,75 мг
	рибофлавина моноклеотид 1,27 мг	кальций 50,5 мг
10	пиридоксина гидрохлорид 5 мг	кобальт 0,1 мг
	аскорбиновая кислота 50 мг	марганец 2,5 мг
	никотинамида 7,5 мг	цинк 2 мг
15	фолиевая кислота 0,1 мг	магний 16,4 мг
	цианокобаламин 12,5 мкг	
	рутозид 25 мг	
20	кальция пантотенат 5 мг	
	липовая кислота 2 мг	

25 Вспомогательные вещества: тальк, крахмал картофельный, лимонная кислота, повидон низкомолекулярный (поливинилпирролидон), кальция октадеканоат (кальция стеарат), сахароза (сахар); гипролоза (гидроксипропилцеллюлоза), макрогол (полиэтиленоксид), повидон низкомолекулярный (поливинилпирролидон), титана диоксид (Е-171), тальк, аспартам.

Таблица 5. Влияние питательной среды на интенсивность роста микроводорослей хлорелла

Фотобио-реактор	Сутки	Цвет	Осадок/пена	Посторонние микр.	Количество клеток*10 ⁷
1	1	Светло салатový	Нет/нет	Нет	1,50
	2	Светло зеленый	Нет/нет	Нет	3,00
	3	Зеленый	Нет/нет	Нет	8,000
	4	Т. Зел.	Нет/нет	Нет	21,00
	5	Т. зел. (свет не проходит)	Нет/нет	Нет	35,00
2	1	Светло салатový	Нет/нет	Нет	1,50
	2	Светло зеленый	Нет/нет	Нет	3,50
	3	Зеленый	Нет/нет	Нет	7,50
	4	Т. Зел.	Нет/нет	Нет	18,50
	5	Т. зел.	Нет/нет	Нет	22,50
3	1	Светло салатový-	Нет/нет	Нет	1,50
	2	Зеленый	Нет/нет	Нет	7,50
	3	Т. зел.	Нет/нет	Нет	22,50
	4	Т. зел. (свет не проходит)	Нет/нет	Нет	38,00
	5	Т. зел. (свет не проходит)	Нет/нет	Нет	41,50
4	1	Светло салатový	Нет/нет	Нет	1,50
	2	Зеленый	Нет/нет	Нет	8,50
	3	Т. Зел.	Нет/нет	Нет	26,50
	4	Т. зел. (свет не проходит)	Нет/нет	Нет	40,00
	5	Т. зел. (свет не проходит)	Нет/нет	Нет	44,50

Таблица 6. Влияние углекислого газа на интенсивность роста микроводорослей хлорелла

Фотобиореактор	Сутки	Цвет	Осадок/пена	Посторонние микр.	Количество клеток*10 ⁷
1	1	Светло салатový	Нет/нет	Нет	1,51
	2	Т. зел.	Нет/нет	Нет	20,00
	3	Т. зел. (свет не проходит)	Нет/нет	Нет	41,50
	4	Т. зел. (свет не проходит)	Нет/нет	Нет	43,00
	5	Т. зел. (свет не проходит)	Нет/нет	Нет	45,53
2	1	Светло салатový	Нет/нет	Нет	1,50
	2	Зеленый	Нет/нет	Нет	18,50
	3	Т. зел.	Нет/нет	Нет	40,50-
	4	Т. зел. (свет не проходит)	Нет/нет	Нет	42,90
	5	Т. зел. (свет не проходит)	Нет/нет	Нет	45,51
3	1	Светло салатový	Нет/нет	Нет	1,50
	2	Зелено-желт.	Нет/нет	Нет	11,50
	3	Зелено-желт.	Нет/нет	Нет	20,00-
	4	Зелено-желт.	Есть/нет	Нет	21,00-
	5	бело-желт.	Есть/есть	Нет	15,50-

(57) Формула изобретения

1. Способ культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris*, включающий выращивание микроводоросли в фотобиореакторе на питательной среде с аэрацией и перемешиванием слоев при искусственном освещении, отличающийся тем, что микроводоросли выращивают в фотобиореакторе с клинообразным дном, для выращивания микроводоросли используют питательную среду Тамия с добавлением 0,01% АСД Ф-2, аэрацию и перемешивание производят с помощью аквариумной помпы и компрессора с одновременной подачей углекислого газа 0,05 л/мин при температуре 30°C и непрерывном освещении люминесцентными лампами 5000 Лк.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что используют фотобиореакторы с прямоугольным поперечным сечением, расстоянием между большими боковыми стенками в 10 см, клинообразным дном, у которых углы между вертикальной стенкой и нисходящей частью дна, между нисходящей и восходящей частями дна и между восходящей частью дна и вертикальной стенкой равны 120°, при этом длина рабочей вертикальной стенки, сопряженной с нисходящей частью дна, равна L, проекция нисходящей части дна на горизонтальное основание равна 2/3 L, а проекция восходящей части дна на горизонтальное основание равна 1/3 L.

