



(51) МПК
C12N 1/12 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/12 (2022.08); *C12P 23/00* (2022.08); *C12R 2001/89* (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022112130, 04.05.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 04.05.2022

Дата регистрации:
 28.02.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 04.05.2022

(45) Опубликовано: 28.02.2023 Бюл. № 7

Адрес для переписки:

299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2,
 Федеральное государственное бюджетное
 учреждение науки Федеральный
 исследовательский центр "Институт
 биологии южных морей имени А.О.
 Ковалевского РАН",
 отдел охраны интеллектуальной собственности

(72) Автор(ы):

Геворгиз Руслан Георгиевич (RU),
 Железнова Светлана Николаевна (RU),
 Нехорошев Михаил Валентинович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 учреждение науки Федеральный
 исследовательский центр "Институт
 биологии южных морей имени А.О.
 Ковалевского РАН" (ФИЦ ИнБЮМ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: UA 63692 U, 25.10.2011. RU 2715039
 С1, 21.02.2020. ГЕВОРГИЗ Р.Г. и др.

"Промышленная технология производства
 фукоксантина, фикобилипротеинов,
 осцилоксантина и миксоксантофилла на основе
 микроводорослей"; Сборник материалов III
 научно-практической конференции с
 международным участием и Научной школы
 по клеточной биотехнологии", 4-8 июня 2018,
 (см. прод.)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ СПИРУЛИНЫ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ
 БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен способ получения биомассы спирулины *Arthrosphaera (Spirulina) platensis*, включающий подготовку инокулята *A. (S.) platensis* и проточное культивирование *A. (S.) platensis* на питательной среде Заррук в двух плоскопараллельных фотобиореакторах при 33-35°C и освещении 20 клк с удельной скоростью протока 0,1-0,2 сут⁻¹ в режиме двухступенчатого хемостата. В первом фотобиореакторе накапливают биомассу *A. (S.) platensis* до достижения стационарной фазы роста; на 8-10-й день культуру переводят в проточный режим

культивирования; при этом из первого фотобиореактора часть рабочего объема переносят во второй; ежедневно из второго фотобиореактора изымают на урожай часть рабочего объема, восстанавливаемого частью рабочего из первого фотобиореактора, а рабочий объем в первом фотобиореакторе восстанавливают добавлением свежей питательной среды. Изобретение обеспечивает повышение выхода биомассы *A. (S.) platensis* с повышенным содержанием биологически активных соединений - С-фикоцианина, липидов и жирных кислот. 1 з.п. ф-лы, 2 ил., 1 табл., 2 пр.

2 790 921 C1

R U 2 7 9 0 9 2 1 C 1

(56) (продолжение):

Якутск, с.38-41. ГЕВОРГИЗ Р.Г. и др. "Модель оптимизации режима культивирования микроводорослей в хемостате на примере *Dunaliella salina* TEOD"; Альгология, 2007, т.17, N 4, с.458-466.

R U 2 7 9 0 9 2 1 C 1

R U 2 7 9 0 9 2 1 C 1



(51) Int. Cl.
C12N 1/12 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12N 1/12 (2022.08); *C12P 23/00* (2022.08); *C12R 2001/89* (2022.08)

(21)(22) Application: 2022112130, 04.05.2022

(24) Effective date for property rights:
04.05.2022

Registration date:
28.02.2023

Priority:

(22) Date of filing: 04.05.2022

(45) Date of publication: 28.02.2023 Bull. № 7

Mail address:
299011, g. Sevastopol, pr. Nakhimova, 2,
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Federalnyj issledovatelskij
tsentr "Institut biologii yuzhnykh morej imeni
A.O. Kovalevskogo RAN", otdel okhrany intellektualnoj
sobstvennosti

(72) Inventor(s):

Gevorgiz Ruslan Georgievich (RU),
Zheleznova Svetlana Nikolaevna (RU),
Nekhoroshev Mikhail Valentinovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Federalnyj issledovatelskij
tsentr "Institut biologii yuzhnykh morej imeni
A.O. Kovalevskogo RAN" (FITS InBYUM) (RU)

(54) METHOD FOR OBTAINING SPIRULINA BIOMASS WITH A HIGH CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology.

A method for obtaining *Arthrosphaera (Spirulina) platensis* biomass is proposed, including preparation of *A. (S.) platensis* inoculum and flow cultivation of *A. (S.) platensis* on a Zarrouk nutrient medium in two plane-parallel photobioreactors at 33-35°C and illumination of 20 klx s specific flow rate 0.1-0.2 day⁻¹ in the two-stage chemostat mode. In the first photobioreactor, *A. (S.) platensis* biomass is accumulated until the stationary growth phase is reached; on the 8-10th day, the culture is transferred to the flow mode of cultivation; at the

same time, part of the working volume is transferred from the first photobioreactor to the second one; daily from the second photobioreactor, a part of the working volume is withdrawn for harvest, which is restored by a part of the worker from the first photobioreactor, and the working volume in the first photobioreactor is restored by adding fresh nutrient medium.

EFFECT: increased yield of *A. (S.) platensis* biomass with high content of biologically active compounds - C-phycocyanin, lipids and fatty acids.

2 cl, 2 dwg, 1 tbl, 2 ex

RU 2790921 C1

RU 2790921 C1

Изобретение относится к области биотехнологии и пищевой промышленности, а именно к способам получения биомассы спирулины *Arthrospira (Spirulina) platensis* с высоким содержанием фикоцианина, липидов и жирных кислот, используемой в качестве сырья для получения биологически активных добавок к пище.

Известно, что биомасса *A. (S.) platensis* характеризуется высокой концентрацией белка (до 70% сухой массы), в частности содержание фикоцианина достигает 8% от сухой массы (Khandual et al., 2021), также ее биомасса содержит все незаменимые аминокислоты, углеводы, липиды, полиненасыщенные жирные кислоты (особенно высокие концентрации линолевой и γ -линоленовой кислот) (Diraman et al., 2009).

В недавних исследованиях показано, что фикоцианин - белок, входящий в состав фотосинтезирующих пигментных комплексов спирулины -- является активным пищевым антиоксидантом (Khandual et al., 2021). Фикоцианин подавляет развитие опухолевых клеток, снижает содержание медиаторов воспаления (Wachda et al., 2019). Кроме этого, он ингибирует окислительный стресс клетки, предотвращает перекисное окисление липидов, повреждения ДНК, разрушение клеточных мембран и гибель клетки (Wachda et al., 2019). Жирные кислоты играют ключевые роли во многих биологических процессах, таких как иммунный ответ, генная регуляция, старение, воспалительные реакции (Гроза и др., 2012). Линолевая и γ -линоленовая кислоты являются мощными внутриклеточными регуляторами функционирования практических систем организма (Гроза и др., 2012).

Известен «Способ получения биомассы зеленых микроводорослей, обогащенных жирными кислотами» (Пат.2507251, РФ, C12N 1/12, C12R 1/89, 2014), включающий культивирование при постоянном освещении и барботировании среды атмосферным воздухом в течение 12-16 суток при температуре 25-27°C с последующим отделением биомассы микроводорослей от питательной среды с получением биомассы микроводоросли, содержащей 33-35% жирных кислот от сухого веса клеток. Недостаток способа заключается в том, что используется накопительный метод культивирования, при котором идет накопление биомассы, затем накопление липидов и жирных кислот (Gao et al., 2019). Однако процессы роста и биосинтеза жирных кислот разобщены, поэтому целесообразнее использовать двухступенчатое проточное культивирование (двухступенчатый хемостат).

Известен «Способ культивирования микроводоросли *Coelastrella rubescens* для получения каротиноидов и липидов» (Пат. 2661086, РФ, C12N 1/12, C12P 23/00, C12R 1/89, 2017), включающий культивирование *Coelastrella rubescens* методом двухстадийной накопительной культуры с соблюдением на I («зеленой») стадии режима освещения 15:9 ч свет : темнота, перевод полученной культуры на II («красную») стадию культивирования путем разведения полученной биомассы редуцированной по азоту и фосфору питательной средой ВВМ с одновременным переходом на круглосуточный режим освещения с интенсивностью ФАР $280 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$. Недостаток способа заключается в гибели немалой части клеток водорослей на втором этапе при создании стрессовых условий, что обусловлено накопительным режимом культивирования и для первой, и для второй ступени двухстадийного способа. В условиях лимитирования для интенсификации биосинтеза целевого вещества на второй стадии гибель клеток снижает эффективность всего технологического процесса.

Наиболее близким к заявляемому способу является способ производства биомассы гидробионтов (Пат. 63692 UA, МПК C12N 1/12, A01K 61/00, 2009), реализующий непропрционально-проточное культивирование спирулины в культиваторе. Способ предусматривает использование питательной среды Заррук в культиваторе при удельной

скорости протока 0.1 сут^{-1} , внесение биомассы, обеспечение заданными температурой и освещенностью в течение 10 сут, сбор урожая. Основным недостатком известного способа является осуществление процесса роста клеток микроводорослей и процесса накопления ценных веществ в одном культиваторе. Известно, что процессы роста и накопления ценных веществ в биомассе микроводорослей разобщены (Sun XM, Ren LJ, Zhao QY, Ji XJ and Huang H. (2018) Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnol Biofuels* (2018) 11:272 doi: 10.1186/s13068-018-1275-9), поэтому получить биомассу спирулины с высоким содержанием биологически активных соединений указанным способом практически невозможно.

Задачей изобретения, касающегося способа получения биомассы спирулины с высоким содержанием биологически активных веществ является усовершенствование технологии культивирования путем создания оптимальных условий культивирования для роста *A. (S.) platensis* и накопления в биомассе *A. (S.) platensis* С-фикоцианина, липидов и жирных кислот.

Техническим результатом заявляемого изобретения является повышение содержания С-фикоцианина, липидов и жирных кислот в биомассе выращенной микроводоросли *A. (S.) platensis*.

Указанный технический результат достигается тем, что Способ получения биомассы *A. (S.) platensis* с высоким содержанием биологически активных соединений включает подготовку инокулята *A. (S.) platensis* и интенсивное проточное культивирование *A. (S.) platensis* на питательной среде Заррук. Культивирование ведут в двух плоскопараллельных фотобиоректорах при освещении 20 клк и температуре 33-35°C с удельной скоростью протока 0,1-0,2 сут⁻¹. В первом фотобиореакторе накапливают биомассу микроводоросли *A. (S.) platensis* до достижения стационарной фазы роста и на 8-10-й день культуру переводят в проточный режим культивирования. Для этого из первого фотобиореактора часть рабочего объема переносят во второй. Для накопления ценных веществ культивирование спирулины переводят в режим двухступенчатого хемостата, для этого ежедневно из второго фотобиореактора изымают на урожай часть рабочего объема, который восстанавливают частью рабочего из первого фотобиореактора, а рабочий объем в первом фотобиореакторе восстанавливают добавлением свежей питательной среды. Кроме того, обеих ступенях хемостата устанавливают одинаковую удельную скорость протока.

Общим с прототипом является использование проточного режима культивирования на питательной среде Заррук.

Отличие заключается в том, культивирование выполняют в двух плоскопараллельных фотобиоректорах в одинаковых условиях, но в первом осуществляют непрерывный активный рост культуры с максимальной продуктивностью, а при достижении стационарной фазы роста часть рабочего объема переносят из первого во второй фотобиореактор, где происходит накопление ценных веществ в биомассе микроводорослей в режиме двухступенчатого хемостата. Предложенные режимы культивирования подобраны авторами экспериментальным путем и способствуют достижению технического результата, указанного заявителем.

Заявляемое техническое решение соответствует критерию «новизна», поскольку вся совокупность существенных признаков изобретения, содержащихся в независимом пункте формулы, не известна из уровня техники. Заявляемое техническое решение соответствует критерию «изобретательский уровень», поскольку оно явным образом не следует из уровня техники. Поиск технических решений того же назначения в

патентных и научно-технических источниках не выявил совпадающих решений. Заявляемое техническое решение соответствует критерию «промышленное применение», поскольку соответствует указанному назначению и может использоваться для культивирования спирулины.

5 Изобретение поясняется иллюстрациями и таблицей. На Фиг. 1 - схема культивирования по заявляемому способу; Фиг. 2 - Динамика плотности культуры спирулины в двухступенчатом хемостате: 1 - первая ступень, 2 -вторая ступень.

Пример 1.

Культуру спирулины выращивали в лабораторных условиях в колбе объемом 0.5 л 10 на стандартной питательной среде Заррук на люминостате, используя накопительный метод культивирования. По мере увеличения плотности культуры добавляли свежую питательную среду Заррук, таким образом поступали до тех пор, пока объем суспензии не достиг 1 л.

После адаптации культуры весь ее объем использовали в качестве инокулята для 15 выращивания спирулины в плоскопараллельных культиваторах (Фиг. 1) объемом 3 л на стандартной питательной среде Заррук при освещении 20 клк и температуре 33-35°C с удельной скоростью протока 0,1 сут-1. По достижении стационарной фазы роста в первом фотобиореакторе на 8-10-й день спирулину переводили в квазинепрерывный 20 режим культивирования в двухступенчатом хемостате. Для этого часть рабочего объема из первого фотобиореактора переносили во второй фотобиореактор. В дальнейшем осуществляли пропорциональнопроточное квазинепрерывное культивирование спирулины в однопоточном режиме следующим образом: ежедневно из второго фотобиореактора (2-я ступень хемостата) изымали часть рабочего объема на урожай; из первого фотобиореактора (1-я ступень хемостата) изымали такую же часть рабочего 25 объема и переносили во второй фотобиореактор, восстанавливая таким образом рабочий объем во втором фотобиореакторе; рабочий объем в первом фотобиореакторе восстанавливали, добавляя свежую питательную среду. После достижения стационарного динамического равновесия (8-е сутки) ежедневно отбирали пробы биомассы спирулины из каждой ступени хемостата для определения массовой доли фикобилипротеинов, 30 липидов и жирных кислот.

Динамика плотности культуры в двухступенчатом хемостате представлена на Фиг. 2.

Для определения массовой доли фикобилипротеинов в сухой биомассе спирулины использовали методику (Геворгиз, 2017). Для определения концентрации липидов и 35 жирных кислот в биомассе спирулины использовали стандартную методу (Кейтс, 1975).

В первой ступени концентрация С-фикоцианнина в биомассе спирулины достигала 12% от сухой массы, а во второй - 16% от сухой массы. Доля липидов в первом культиваторе составляла 7% от сухой массы, а во втором фотобиореакторе - 11%. При этом содержание жирных кислот и в первой, и во второй ступени составляла 70% от 40 суммарных липидов. В пересчете на сухую биомассу - 49 мг/г в первой ступени и 77 мг/г во второй.

Таблица 1. Химический состав биомассы спирулины, выращенной в двухступенчатом хемостате.

Скорость протока, сут ⁻¹	Концентрация С-фикацианина, %	Концентрация суммарных липидов, %
0.1	16	11
0.2	13	9

10 Впоследствии урожай собирали ежедневно в стационарном динамическом равновесии (15-25 день культивирования), химический состав биомассы оставался неизменным.

Пример 2.

15 После адаптации культуры, как описано в примере 1, весь ее объем использовали в качестве инокулята для выращивания спирулины в плоскогарнельных культиваторах объемом 3 л в режиме двухступенчатого хемостата с удельной скоростью протока 0,2 сут⁻¹. При различных условиях культивирования (свет, температура и пр.) оптимальный проток будет разным. Увеличивая проток, можно получать больший урожай, но с меньшим содержанием ценных веществ. Т.е. изменения проток, изменяются условия культивирования.

20 В первой ступени концентрация С-фикацианина в биомассе спирулины достигала 9% от сухой массы, а во второй - 13% от сухой массы. Доля липидов в первой ступени составляла 5% от сухой массы, а во второй - 9% от сухой массы. При этом содержание жирных кислот и в первой, и во второй ступени составляло 70% от общий липидов. В пересчете на сухую биомассу - 35 мг/г в первой ступени и 63 мг/г - во второй.

25 Культивирование спирулины в стандартных условиях позволяет получать биомассу с содержанием С-фикацианина не более 8-11% от сухой массы (Гудвилович и др., 2015; Минюк и др., 2002). Такие же результаты достигаются при использовании различных источников азота для культивирования спирулины (Дробецкая и др., 2002; Дробецкая и др., 2004).

30 Источники литературы, принятые во внимание:

1. Грода Н.В. Терапевтическая роль полиненасыщенных жирных кислот и их производных в патофизиологических процессах / Н.В. Грода, А.Б. Голованов, Е.А. Наливайко, Г.И. Мягкова // Вестник МИТХТ. - 2012. - Т. 7, №5. - С. 3-16.

35 2. Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В. Количество определение массовой доли С-фикацианина и аллофикацианина в сухой биомассе *Spirulina (Arthospira) platensis* North. Geitl. Холодная экстракция: учебно-методическое пособие. - Севастополь, 2017. - 21 с. - (Препринт / РАН, ИМБИ)

40 3. Гудвилович И.Н., Боровков А.Б., Тренкеншу Р.П. Опыт выращивания микроводорослей-продуцентов БАВ в полупромышленных условиях // Современные технологии продуктов питания. Сборник научных статей. - Курск, 2015. - С. 44-50.

45 4. Дробецкая И.В. Использование мочевины при выращивании синезеленой микроводоросли *Spirulina platensis* (Nords.) Geitl. в накопительной культуре // Экология моря. - 2002. - Вып. 60. - С. 53-59.

5. Дробецкая И. В., Минюк Г. С. Использование мочевины при выращивании цианобактерии *Spirulina (Arthospira) platensis* методом непропорционально проточной культуры // Экология моря. - 2004. - Вып. 65. - С. 28-34.

6. Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Тренкеншу Р.П., Вялова О.Ю. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina (Arthospira) platensis* (Nordst.) Geitler при

различных условиях азотного питания // Экология моря. - 2002. - Вып. 62. - С. 61-66.

7. Кейтс М. Техника липидологии: выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс / Пер. с англ. д-ра хим. наук В.А. Вавера. - Москва: Мир, 1975. 322 с.

8. Diraman H. Fatty acid profile of *Spirulina platensis* used as a food supplement / H. Diraman,

5 E. Koru, H. Dibeklioglu // The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh. - 2009. - Vol. 61, iss. 2. - P. 134-142. doi: 10.46989/001c.20548

9. Gao G. A two-stage model with nitrogen and silicon limitation enhances lipid productivity and biodiesel features of the marine bloom-forming diatom *Skeletonema costatum* I G. Gao, M. Wu, Q. Fu, X. Li, J. Xu // Bioresource Technology. - 2019. - Vol. 289. - P. 1-9. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121717.

10 10. Khandual S. Phycocyanin content and nutritional prone of *Arthrospira platensis* from Mexico: efcient extraction process and stability evaluation of phycocyanin / S. Khandual, E.O. Lopez Sanchez, H. Espinosa Andrews, J.D.P. de la Rosa // BMC Chemistry. - 2021. - Vol. 15, iss. 1. - P. 1-13. doi: 10.1186/s13065-021-00746-1

15 11. Michalak I. Biofortification of hens eggs with polyunsaturated fatty acids by new dietary formulation: supercritical microalgal extract /I. Michalak, M. Andrys,

M. Korczy'nski, S. Opali'nski, B. Łeska, D. Konkol, R. Wilk, E. Rój, K. Chojnacka // Animals. - 2020. - Vol. 10, iss. 3. - P. 1-14. doi: 10.3390/ani10030499

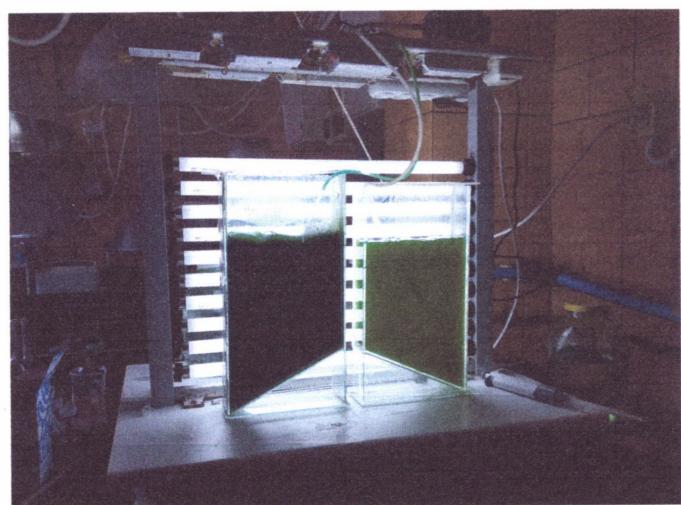
20 12. Wachda H. Production of antioxidant C-phycocyanin using extraction process of *Spirulina platensis* in large scale industry / Wachda, H. Hadiyanto, G.D. Harjanto, M.L. Huzain, R.W. Aji // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. - 2019. - Central Java, Indonesia. - P. 1-5 doi: 10.1088/1757-899X/633/1/012025

(57) Формула изобретения

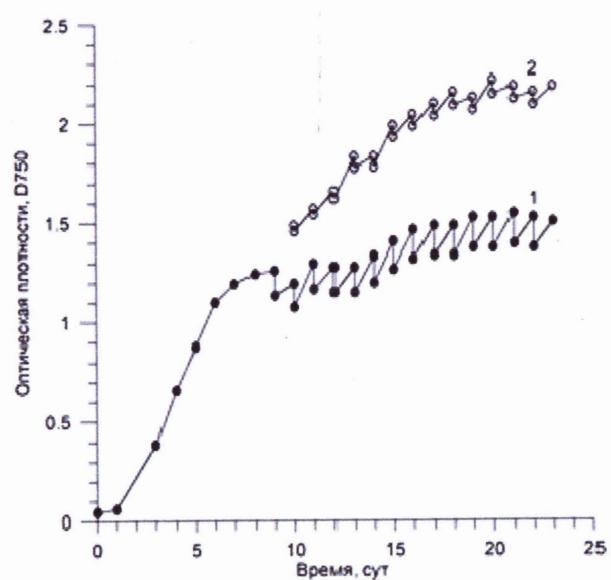
25 1. Способ получения биомассы спирулины с высоким содержанием биологически активных соединений, включающий подготовку инокулята *A. (S.) platensis* и интенсивное проточное культивирование *A. (S.) platensis* на питательной среде Заррук, отличающийся тем, что культивирование ведут в двух плоскопараллельных фотобиореакторах при

30 освещении 20 клк и температуре 33-35°C с удельной скоростью протока 0,1-0,2 сут⁻¹, причем в первом фотобиореакторе накапливают биомассу микроводоросли *A. (S.) platensis* до достижения стационарной фазы роста и на 8-10-й день из первого фотобиореактора часть рабочего объема переносят во второй, а затем для накопления ценных веществ культивирование спирулины переводят в режим двухступенчатого 35 хемостата, для чего ежедневно из второго фотобиореактора изымают на урожай часть рабочего объема, который восстанавливают частью рабочего из первого фотобиореактора, а рабочий объем в первом фотобиореакторе восстанавливают добавлением свежей питательной среды.

40 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в обеих ступенях хемостата устанавливают одинаковую удельную скорость протока.



Фиг. 1



Фиг. 2