



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 110770

(13) C2

(51) МПК

C12N 1/12 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2015 09805

(22) Дата подання заявки: 09.10.2015

(24) Дата, з якої є чинними  
права на винахід: 10.02.2016(41) Публікація відомостей 10.12.2015, Бюл.№ 23  
про заявку:(46) Публікація відомостей 10.02.2016, Бюл.№ 3  
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

Голуб Наталя Борисівна (UA),

Левтун Ігор Ігорович (UA)

(73) Власник(и):

Голуб Наталя Борисівна,

вул. Патріотів, 98, кв. 122, м. Київ-61, 03061  
(UA),

Левтун Ігор Ігорович,

вул. Тургенєвська, 81, кв. 8, м. Київ-50,  
04050 (UA)(56) Перелік документів, взятих до уваги  
експертизою:

UA 57962 A, 15.07.2003

EA 017614 B1, 30.01.2013

ZHANG et al. "Biologic Effect of Ultrasonic  
Radioatom on Marine Chlorella" Xiamen  
daxue xuebao. Ziran kexue ban=J. Xiamen  
Univ. Natur. Sci.. 2001. 40, N 3, с. 653-657

## (54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ CHLORELLA VULGARIS

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі біотехнології, а саме до біотехнології культивування одноклітинних мікроводоростей.

В основу винаходу поставлено задачу інтенсифікації процесу вирощування біомаси з підвищеним вмістом ліпідної фракції шляхом використання ультразвукового опромінення низької частоти.

Запропоновано спосіб культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* у закритих світлопроникних ємностях або відкритих ставках, що включає перемішування середовища та барботування культурального середовища вуглекислим газом. Також проводиться періодична обробка через 12-24 години середовища ультразвуком частотою 20-50 кГц силою звуку 0,5-5 Вт/см<sup>2</sup> протягом 5-600 сек.

Опромінення культури ультразвуком прискорює мембранний транспорт та створює необхідний стресовий фактор для накопичення клітинами ліпідної фракції.

UA 110770 C2



Винахід належить до біотехнології, а саме до біотехнології культивування одноклітинних мікроводоростей, і може бути використаний при виробництві біодизельного пального другого покоління, при виробництві біологічно-активних добавок у харчовій промисловості та сільському господарстві, а також у фармацевтичній промисловості.

Для культивування мікроводоростей пропонується "Спосіб культивирования микроводорослей на основе штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № с-111" [патент РФ на винахід № 2176667, МПК С12Н1/12, С12М3/00, С12М3/04, 2001], спосіб культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris*, що передбачає розлив культурального середовища в ємності, внесення інокуляту штаму, освітлення та підтримання постійної температури суспензії, особливістю методу є розміщення ємностей для культивування навколо джерела штучного світла. Період освітлення складає 22 години на добу, нагрівання здійснюється за допомогою ламп і температура підтримується на рівні 30 °С, культивування проводиться на середовищі, склад якого вказано у патенті, середовище вноситься по 18 літрів у 20 літрові ємності, потім вноситься 2 літри інокуляту. Під час культивування лампа поступово опускається для більш рівномірного опромінення. Культивування проводиться протягом 4 діб після чого біомаса відділяється, і проводиться нове культивування.

Недоліком способу є відсутність перемішування, що призводить до нерівномірного освітлення суспензії клітин, за якого частина клітин, які розташовані поблизу лампи гине, інша, яка знаходиться в темряві, не розвивається і біомаса не накопичується. Також відсутність перемішування сприяє закріпленню мікроводоростей на поверхні реактора, що призводить до зниження інтенсивності освітлення, і як наслідок зниження темпів приросту біомаси. Такий спосіб також не підвищує вихід ліпідної фракції - сировини для виготовлення біодизельного палива.

Відомий також "Способ искусственного культивирования микроводорослей и установка для его осуществления" [патент РФ на винахід № 2175013, МПК С12Н1/00, А01G33/00, 2001], культивування мікроводоростей здійснюють шляхом фотосинтезу при впливі на них радіолюмінесцентного випромінювання і тепла, створюваного проникаючим ядерним випромінюванням, при цьому спектр радіолюмінесцентного випромінювання може бути вибраний резонансно для співпадіння зі спектром дії фотосинтезу.

Штучним джерелом енергії служить джерело проникаючих ядерних випромінювань, джерелом люмінесцентного оптичного випромінювання - радіолюмінофор, тепло генерується в середовищі джерела ядерних випромінювань. Як джерело ядерних випромінювань може бути вибраний ядерний реактор, в тому числі реактор-розмножувач з уран-торієвим циклом, в тому числі у вигляді решітки з ядерних радіолюмінесцентних ламп, які з усіх боків оточені світлоприймальними кюветами з суспензією культивованих мікроводоростей.

Недоліком способу є те, що виробництво мікроводоростей прив'язане до атомних електростанцій; при використанні радіаційного опромінення як стресового фактора вихідні продукти, а саме ліпідна фракція, суха маса мікроводоростей, біологічні активні добавки та інші продукти будуть мати радіаційний фон, що робить їх використання небезпечним для здоров'я людини; виникає необхідність утилізації радіаційно забруднених речовин.

Найбільш близьким аналогом способу, що заявляється, є "Способ культивирования микроводорослей" [патент України на винахід № 57962, МПК А01G31/00, 2003]. Спосіб включає вирощування мікроводоростей у закритому об'ємі, мікроводорості вирощують у закритому нерухомому об'ємі, освітлюваному щільними світловодами, утвореними із поверхонь самопливних шарів суспензії на підтримуючих поверхнях плівок, сіток, джгутів, стрічок, нахилених до горизонту під кутом, меншим або рівним 90°, зібраних у пакети чи пакеті-барабани, що обертаються, прикритих незараженим газом з регульованим вмістом кисню і двоокису вуглецю. Рекомендовано використовувати стандартні середовища для культивування за даним способом.

Недоліком способу є іммобілізація клітин на поверхні носіїв, що призводить до затемнення клітин, які розташовані в глибині біоплівки, і, відповідно, зниженню інтенсифікації процесу утворення біомаси. Також при використанні даного способу ускладнюється виділення біомаси з реактора, що призводить до втрат продукту. Також не відбувається направлено біосинтезу з утворенням певного продукту, в даному випадку - ліпідної фракції.

В основу винаходу поставлено задачу інтенсифікації процесу вирощування біомаси з підвищеним вмістом ліпідної фракції шляхом використання ультразвукового опромінення низької частоти 20 50 кГц, силою звуку випромінювання до 50 кВт/м<sup>2</sup>.

Поставлена задача вирішується за рахунок того, що спосіб культивування мікроводоростей у закритих світлопроникних ємностях або відкритих ставках, що включає перемішування середовища та барботування культурального середовища вуглекислим газом, згідно з

винаходом, новим є те, що для інтенсифікації процесу вирощування та збільшення в клітинах вмісту ліпідної фракції проводиться періодична обробка через 12-24 години середовища ультразвуковим опроміненням частотою 20-50 кГц.

Для вирощування мікроводоростей необхідні сонячна енергія у діапазоні 400-700 нм, вода, та неорганічні поживні речовини. Серед поживних речовин визначальними є сполуки карбону, нітрогену, фосфору, сульфуру та деякі мікроелементи (K, Na, Mg, Zn, Fe тощо).

У процесі фотосинтезу мікроводорості поглинають вуглекислий газ та виділяють кисень, нарощуючи біомасу. За звичайного вмісту CO<sub>2</sub> в повітрі його концентрація складає 0,03 %, що недостатньо для швидкого розмноження мікроводоростей і інтенсивного приросту біомаси. Тому введення в культуральне середовище додаткової кількості CO<sub>2</sub> шляхом барботування призводить до інтенсифікації процесів поділу та росту клітин, і, відповідно, підвищених темпів приросту біомаси. Для уникнення пошкодження клітин пухирцями газу система подачі CO<sub>2</sub> містить аероліфтну систему.

Оскільки інтенсивність проходження світла крізь суспензію мікроводоростей знижується експоненціально, то для рівномірного забезпечення світлом усіх клітин мікроводоростей використовується перемішування. Перемішування може відбуватись за використання механічних, гідравлічних, пневматичних методів, систем ерліфту та за допомогою магнітного поля.

Дія ультразвукового опромінення низької частоти на клітини мікроводоростей призводить до зміни умов транспорту іонів та речовин через клітинну мембрану, мембрани мітохондрій та хлоропластів, що призводить до інтенсифікації обмінних процесів клітини і як наслідок підвищення накопичення біомаси. Одночасно ультразвукове опромінення низькими частотами призводить до інтенсифікації дифузійних процесів в результаті перемішування рідини (акустичні потоки), прискорення хімічних процесів, що протікають в розчинах, на які впливає ультразвукове опромінення і, відповідно, до інтенсифікації процесу культивування мікроводоростей і збільшення швидкості нарощування біомаси. Так, при періодичній дії через 12 годин ультразвукового опромінення частотою 20 кГц силою звуку 1-5 Вт/см<sup>2</sup> протягом 1 хвилини швидкість приросту біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris* за стандартних умов на середовищі Громова № 6 збільшується у 3-4 рази відносно суспензії, яку не опромінено. При використанні опромінення частотою 50 кГц силою звуку 1-5 Вт/см<sup>2</sup> протягом 5 секунд 1 раз на добу, швидкість приросту біомаси збільшується у 1,2 разу, але масова частка ліпідної фракції у клітинах мікроводоростей збільшується у 4-5 разів, ніж при звичайному культивуванні і може досягати 80 % маси клітин. При використанні опромінення частотою 35 кГц силою звуку 0,5-5 Вт/см<sup>2</sup> протягом 30 секунд через кожні 20 годин приріст біомаси збільшується лише у 1,5-2 рази і збільшується масова частка ліпідів. При застосуванні опромінення більшої частоти, ніж 50 кГц відбувається загибель клітин.

Також періодична дія ультразвукового опромінення низької частоти є стресовим фактором, що викликає розвиток у клітині процесів післядії, які призводять до морфологічних і функціональних змін, що, у свою чергу, призводять до зміни метаболічних процесів в бік підвищеного синтезу ліпідної фракції клітин. Так, при періодичній дії через 12 годин ультразвукового опромінення частотою 20 кГц силою звуку 0,5-5 Вт/см<sup>2</sup> протягом 1 хвилини швидкість приросту біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris* за стандартних умов збільшується у 3-4 рази відносно суспензії, яку не опромінено. Масова частка ліпідної фракції досягає 55 % сухої біомаси мікроводоростей. При використанні опромінення частотою 50 кГц силою звуку 0,5-5 Вт/см<sup>2</sup> протягом 5 секунд 1 раз на добу, швидкість приросту біомаси збільшується у 1,2 разу, але масова частка ліпідної фракції у клітинах мікроводоростей збільшується у 4-5 разів, ніж при звичайному культивуванні, і може досягати 80 % маси клітин. При використанні опромінення частотою 35 кГц силою звуку 0,5-5 Вт/см<sup>2</sup> протягом 30 секунд через кожні 20 годин приріст біомаси збільшується лише у 1,5-2 рази і збільшується масова частка ліпідів. При застосуванні опромінення більшої частоти, ніж 50 кГц відбувається загибель клітин.

Спосіб реалізується за схемою, сутність якої представлено на Фіг.1. для фотореакторів та фіг. 2 для ставків.

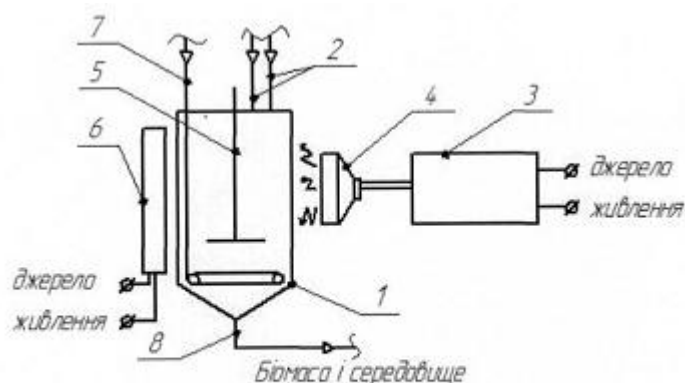
Спосіб реалізується наступним чином. У фотореактор 1 (фіг. 1, фіг. 3) при періодичному культивуванні вносять через отвори 2 визначену кількість необхідних поживних речовин та засівають мікроводорості. У разі неперервного культивування через отвір 2 здійснюють постійну подачу поживного середовища. Також через отвір 2 здійснюється вивід кисню, що утворюється в процесі життєдіяльності мікроводоростей. Через вивід 8 (фіг. 1, фіг. 3) здійснюється періодичне або постійне виведення нарощеної біомаси мікроводоростей. Перемішування одержаної суспензії здійснюють за допомогою перемішувача пристрою 5 (фіг. 1) або за

використання ерліфтної системи (фіг. 3 позиція 11), для чого застосовується система подачі барботажної суміші, яка містить CO<sub>2</sub> та повітря. У разі використання інших типів перемішувачів пристроїв карбон (IV) оксид подається через отвір 7 (фіг. 1, фіг. 3). Система освітлення в темновий період у разі використання сонячного випромінювання та при застосуванні штучного освітлення 6 (фіг. 1, фіг. 3) контролюється за допомогою реле часу і випромінює спектр, який необхідний для здійснення фотосинтезу з великою швидкістю. Ультразвукові п'єзовипромінювачі 4 (фіг. 1, фіг. 3) встановлюються через 1,5-2 м один від одного у разі використання трубчатих фотореакторів довжиною більше 2 метрів. Експериментально встановлено, що раціональне розповсюдження такого випромінювання відбувається в радіусі 1 м. П'єзовипромінювач 4 (фіг. 1, фіг. 3) встановлюється на відстані 1-5 см від зовнішньої стінки фотореактора. У разі використання ставка п'єзовипромінювач 4 (фіг. 2) встановлюється на плаваючій платформі 10 (фіг. 2) і керується за допомогою системи управління 9 (фіг. 2). Опромінення частотою 20-50 кГц силою звуку до 50 кВт/м<sup>2</sup> здійснюється протягом визначеного часу для кожної частоти кожні 12-24 години.

Для створення ультразвукових коливань запропоновано використовувати п'єзоелемент 4 (фіг. 1, фіг. 2, фіг. 3) як джерело коливань, оскільки на відміну від інших типів випромінювачів він є більш довговічним та легше регульованим. Генератором прямокутних імпульсів 3 (фіг. 1, фіг. 3) для випромінювача запропоновано використовувати генератори з регульованою частотою та підсиленням. Регуляція частоти у генераторі дозволяє його використання не лише для стимуляції росту мікродоростей на низьких частотах, а й для припинення їхньої життєдіяльності, за допомогою більш високих частот >50 кГц, при закінченні періоду культивування при періодичному режимі. У разі використання неперервного процесу руйнування клітин здійснюється після виводу з реактора.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб культивування мікродоростей *Chlorella vulgaris* у закритих світлопроникних ємностях або відкритих ставках, що включає перемішування середовища та барботування культурального середовища вуглекислим газом, який відрізняється тим, що проводиться періодична обробка через 12-24 години середовища ультразвуком частотою 20-50 кГц силою звуку 0,5-5 Вт/см<sup>2</sup> протягом 5-600 сек.



Фіг. 1

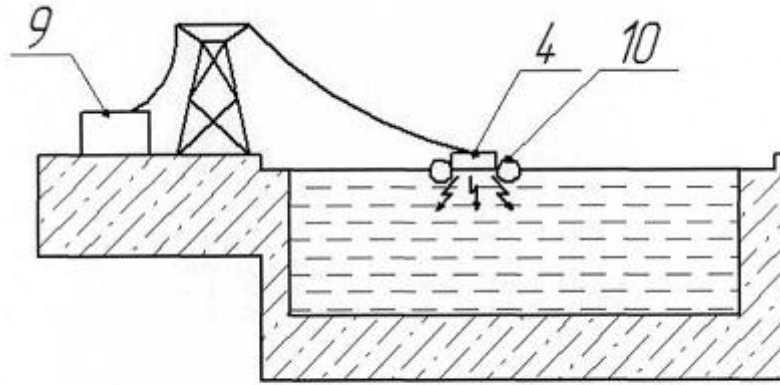


Fig. 2

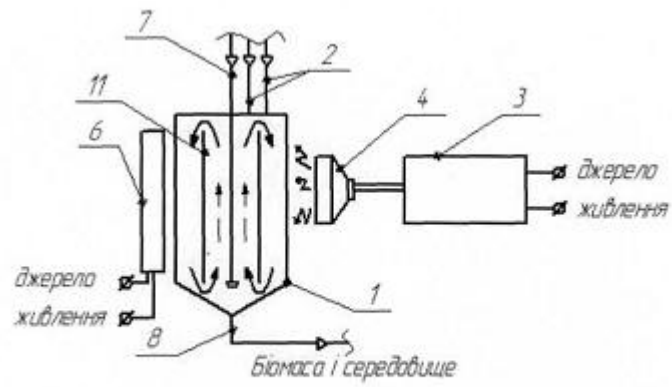


Fig. 3

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601