



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102272** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)

A01G 33/00

A01H 13/00

C12N 1/12 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2011 05347**
(22) Дата подання заявки: **26.04.2011**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.06.2013**
(41) Публікація відомостей про заяву: **10.05.2012, Бюл.№ 9**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.06.2013, Бюл.№ 12**
(72) Винахідник(и):
**Гудвілович Ірина Миколаївна (UA),
Боровков Андрій Борисович (UA),
Тренкеншу Рудольф Павлович (UA)**
(73) Власник(и):
**ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ПІВДЕННИХ МОРІВ ІМ.
О.О. КОВАЛЕВСЬКОГО НАН УКРАЇНИ,
пр. Нахімова, 2, м. Севастополь, 99011 (UA)**

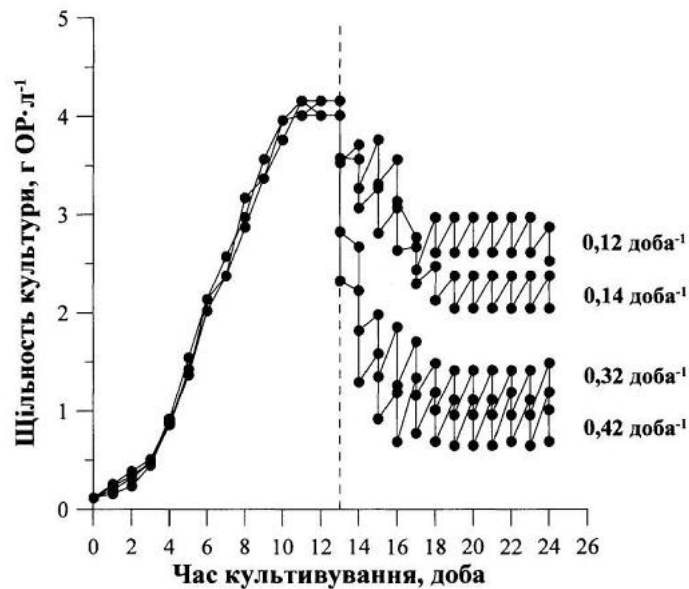
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Dipak S. Pisal, S.S. Lele. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. Indian Journal of Biotechnology.
Зосимов Г.А. Научно-технический отчет по исследованию состава образцов морской соли. Лаборатория КГЭ Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Документ створено 15 листопада 2009 р. М. А. Borowitzka. THE MASS CULTURE OF DUNALIELLA SALINA. REGIONAL SEAFARMING DEVELOPMENT AND DEMONSTRATION PROJECT RAS/90/002. 27–31 August 1990 Cebu City. PHILIPPINES. Regional Seafarming Development and Demonstration Project Network of Aquaculture Centres in Asia. Bangkok, Thailand. JP56051980 A, 09.05.1981
Garcia-Gonzalez M., Moreno J., Canavate J.P., Anguis V., Prieto A., Manzano C., Florencio F.G., Guerrero M.G. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain // J Appl. Phycol. - 2003. - 15. - P. 177-184.
Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. // Биология моря. - 1979. - № 51. - с. 41-46
Бородин А.В., Боровков А.Б.. Потребление азота и фосфора микроводорослью *DUNALIELLA SALINA* при различных режимах культивирования. Экология моря. 2005.
Харчук И.А.. Влияние температуры дегидратации на нуклеиновые кислоты *DUNALIELLA SALINA*. Экология моря. 2005. - Вып. 69.
Боровков А.Б., Сафиулин З.Т., Панченко Н.В.. Рост *DUNALIELLA SALINA* в смешанной культуре. Экология моря. 2005. - Вып. 67.

**(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ОДНОКЛІТИННОЇ ЗЕЛЕНОЇ МІКРОВОДОРОСТІ DUNALIELLA SALINA
ДЛЯ ОТРИМАННЯ БІОМАСИ**

UA 102272 C2

(57) Реферат:

Заявлений спосіб культивування одноклітинної зеленої мікроводорості *Dunaliella salina* для отримання біомаси, у якому використовують квазібезперервний режим культивування. Культуру, вирощену на модифікованому поживному середовищі Тренкеншу методом накопичувальних культур до щільності 1,5-3 г ОР·л⁻¹, переводять у квазібезперервний режим культивування. Подальше вирощування здійснюють при питомій швидкості потоку середовища близько 0,3 доби⁻¹, при цілодобовому освітленні з поверхневою освітленістю 80 Вт·м⁻², безперервній продукції газоповітряною сумішшю зі швидкістю 1 л суміші·хв⁻¹·л⁻¹ культури, яка містить 3 % CO₂, і температурі 26-28 °С, на модифікованому поживному середовищі Тренкеншу.



Фіг. 1

Винахід належить до біотехнології мікроводоростей і може бути використаний при промисловому одержанні біомаси мікроводорості *Dunaliella salina*.

Зелена одноклітинна водорість *Dunaliella salina* - об'єкт масового промислового культивування для отримання вітамінів, ліпідів, спиртів (зокрема, етанолу) та антибіотиків. Біомаса активно зростаючої мікроводорості *D. salina*, за даними багатьох авторів, має збалансований біохімічний склад (вміст білка до 60 %, вуглеводів - 8,40-12,70 %, ліпідів - 7,70-10,80 %). Вміст цінного пігменту хлорофілу а може досягати понад 5 % на абсолютно суху масу. Крім того, біомаса зеленої мікроводорості *D. salina* є джерелом біоактивних речовин, які мають антиоксидантні властивості, таких як ліпіди (поліненасичені жирні кислоти), каротиноїди (β -каротин, лютеїн, зеаксантин та ін), вітаміни (токоферол) і ін. На відміну від інших водоростей, клітини *D. salina* позбавлені целюлозної або пектинової оболонки і оточені лише тонкою еластичною протоплазматичною мембраною (плазмалемою), що істотно полегшує засвоєння біомаси водорості. Завдяки цим цінним якостям біомаса *D. salina* широко застосовується у світовій практиці як кормова добавка.

Промислові технології, які використовують в цей час, орієнтовані на отримання біомаси *D. salina*, збагаченої β -каротином за умов використання збіднених середовищ, тому ще саме в таких умовах відбувається накопичення вторинних каротиноїдів. Склад поживного середовища Тренкеншу дозволяє отримувати щільну культуру Дуналієлла, яка характеризується високими продукційними характеристиками.

На практиці застосовуються такі методи культивування *D. salina*: накопичувальний, безперервний, непропорційно-проточний, квазібезперервний. Проте найчастіше для вирощування *D. salina* використовують накопичувальний режим культивування, який є найбільш розробленим і вивченим. Можливості квазібезперервної культури (особливо щільної) реалізовані слабо.

Відомо спосіб квазібезперервного культивування *D. salina*, при якому вирощування мікроводорості відбувається у відкритих резервуарах, [див. Garcia-Gonzalez M., Moreno J., Canavate J. P., Anguis V., Prieto A., Manzano C, Florencio F. G., Guerrero M.G. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain // J Appl. Phycol.-2003.-15. - P. 177-184]. Культивування здійснюють при природній освітленості і температурі. У способі водорість вирощують методом квазібезперервної культури на живильному середовищі з вмістом NaNO_3 5 мМ і 2 М NaCl при природному освітленні, додаванні свіжого середовища кожні 2 доби до початкової щільності культури $0,7-0,9 \cdot 10^6$ кл.мл⁻¹. Водорості вирощують в овальних пластикових басейнах з площею поверхні 3 м² і глибиною 0,3 м при природному рівні освітленості і температурі. При такому режимі культивування середня продуктивність складає 1,65 г сухої речовини (СР), а β -каротину - 0,1 г з 1 м на добу.

Зазначена робота має принципове значення, тому що підтверджує можливість отримання біомаси *D. salina* при вирощуванні в квазібезперервному режимі. Однак запропонований режим культивування має деякі обмеження для використання в промислових масштабах. Найбільш важливими з них є:

а) складність в регулюванні ступеня розбавлення до первісної щільності культури;

б) більш низька продуктивність з одиниці об'єму в порівнянні із запропонованим способом.

В основу винаходу Спосіб культивування зеленої мікроводорості *Dunaliella salina* поставлено задачу підвищення ефективності способу шляхом зростання продуктивності культури при використанні концентрованого поживного середовища і квазібезперервного режиму вирощування.

Спосіб культивування зеленої мікроводорості *Dunaliella salina* для отримання біомаси засновано на використанні квазібезперервного режиму, а підбір умов культивування, що сприяють накопиченню в клітинах пігментів і білка, виконали автори в лабораторних експериментах.

Поставлена задача вирішується тим, що культуру, вирощену на модифікованому поживному середовищі Тренкеншу (Тренкеншу Р. П., Белянин В. Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. // Биология моря.-1979. - № 51. - С. 41-46.) методом накопичувальних культур до щільності 1,5-3 г ОВ - л⁻¹ (грам органічної речовини на 1 літр), переводять на квазібезперервний режим культивування. Квазібезперервну культуру отримують шляхом періодичної (з інтервалом у 24 години) заміни частини суспензії мікроводорості рівноцінним об'ємом свіжоприготованого поживного середовища. Кожні 24 години з культиваторів відбирають 12, 14, 32 і 42 % обсягу культури ($\omega = 0,12-0,42$ доба⁻¹) і замінюють його рівноцінним об'ємом свіжого поживного середовища. Вирощування *D. salina* здійснюють з питомою швидкістю потоку поживного середовища близько 0,1-0,4 доба⁻¹; при цілодобовому освітленні люмінесцентними лампами денного світла, які забезпечують

поверхневу освітленість $80 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$; безперервної продувці газоповітряною сумішшю: на 1 літр культури міководорості - 1 літр газоповітряної суміші в 1 хвилину ($1 \text{ л}\cdot\text{хв}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$ культури), що містить 3 % CO_2 (за об'ємом) і температурі $26-28^\circ\text{C}$.

5 Спільним для прототипу і способу, що заявляється, є застосування квазібезперервного режиму культивування. Основна відмінність від прототипу полягає в тому, що у заявленому способі при культивуванні використовують метод квазібезперервної культури зі швидкістю протоки близько $0,3 \text{ доби}^{-1}$.

10 Винахід пояснюється кресленнями Фіг. 1 - Динаміка щільності накопичувальної і квазібезперервної культури *Dunaliella salina* при різній швидкості протоки поживного середовища (пунктирна лінія - границя між накопичувальним і квазібезперервним культивуванням). Фіг. 2 - Залежність відносного вмісту пігментів в клітинах *Dunaliella salina* від питомої швидкості протоки поживного середовища в квазібезперервній культурі. Фіг. 3 - Залежність відносного вмісту білка в клітинах *Dunaliella salina* від питомої швидкості протоки поживного середовища в квазібезперервній культурі.

15 Спосіб культивування одноклітинної зеленої водорості *Dunaliella salina* реалізується наступним чином:

Для культивування може бути використаний будь-який штам *Dunaliella salina*, наприклад IBSS-1, IBSS-2, IBSS-3. Їх колекційне зберігання здійснюють на поживному середовищі Ben-Amotz, і температурі $15-18^\circ\text{C}$ з пересівом кожні 1,5-2 місяці.

20

Таблиця 1

Склад модифікованого поживного середовища
Тренкеншу для квазібезперервного культивування *Dunaliella salina*

| Компонент | Маса, $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}$ |
|--|------------------------------------|
| Морська сіль | 120 |
| NaNO_3 | 2,139 |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,30 |
| Na_2EDTA | 0,037 |
| $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,042 |
| $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,0040 |
| $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,0031 |
| $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,0009 |
| $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \times 24\text{H}_2\text{O}$ | 0,0017 |

Отримання інокуляту. Для отримання інокуляту культуру водорості з музею 5-7 днів вирощують методом накопичувальної культури на модифікованому середовищі Тренкеншу, яке розводять водою 1:1, при освітленні $24 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$. Потім культуру переносять у нерозведене модифіковане середовище Тренкеншу і продовжують культивувати при штучному освітленні люмінесцентними лампами денного світла $80 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$ в накопичувальному режимі при безперервному барботажі газоповітряною сумішшю ($1 \text{ л}\cdot\text{хв}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$ культури), що містить 3 % CO_2 (за об'ємом). Для засіву культиваторів використовують культуру, яка активно ділиться, взяту на лінійній стадії зростання, коли її продуктивність максимальна. Суспензію клітин вносять у культиватори з такого розрахунку, щоб початкова щільність культур становила не менше $0,1-0,2 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ сухої речовини.

35 Процес культивування. Живильним середовищем для пропонованого способу культивування служить модифіковане середовище Тренкеншу. Модифікація полягає у збільшенні солоності середовища за рахунок додавання хлориду натрію або морської солі до концентрації 120 г/л . Вирощування водорості здійснюють при поверхневій освітленості культиваторів близько $80 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$, швидкості продування газоповітряною сумішшю $1 \text{ л}\cdot\text{хв}^{-1}\cdot\text{л}^{-1}$ культури, яка містить 3 % CO_2 і температурі поживного середовища $26-28^\circ\text{C}$. Спочатку *D. salina* культивують в накопичувальному режимі на модифікованому середовищі Тренкеншу до щільності культури $1,5-3 \text{ г ОР}\cdot\text{л}^{-1}$. Далі культуру переводять на квазібезперервний режим, тобто з інтервалом в 24 години з культиваторів відбирають 10-40 % обсягу культури, замінюючи його рівноцінним об'ємом свіжого середовища.

40 Для встановлення умов культивування, що сприяють накопиченню в клітинах пігментів і білка, автори проводили культивування *D. salina* в чотирьох варіантах квазібезперервного режиму у 6-літрових культиваторах на модифікованому поживному середовищі Тренкеншу при

цілодобовій поверхневій освітленості $80 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$, швидкості продування газоповітряною сумішшю зі швидкістю $1 \text{ л суміші} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ культури, яка містить 3 % CO_2 і температурі $26-28^\circ \text{C}$. Об'єм культури в культиваторах становив 5 л, початкова щільність культури - $0,12 \text{ г ОР} \cdot \text{л}^{-1}$. Кожні 24 години з культиваторів відбирали 12, 14, 32 і 42 % об'єму культури ($\omega = 0,12-0,42 \text{ доби}^{-1}$) і

замінювали його рівноцінним об'ємом свіжого середовища. При квазібезперервному режимі відбувається систематичне внесення біогенів в культуру, і зі збільшенням питомої швидкості потоку кількість азоту і фосфору, внесеного в культуру, пропорційно збільшується. При цьому щільність культури змінюється і досягає стаціонарної динамічної рівноваги (Фіг. 1, табл. 2).

Таблиця 2

Відносний вміст фотосинтетичних пігментів і білка в клітинах квазібезперервної культури *Dunaliella salina* при різних питомих швидкостях потоку поживного середовища.

| Питома швидкість потоку, доби^{-1} | Щільність культури, $\text{г ОР} \cdot \text{л}^{-1}$ | ХЛ а, % ОР | ХЛ b, % ОР | Каротиноїди, % ОР | Білок, % ОР |
|---|---|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|
| 0,12 | $2,96 \pm 0,15$ | $2,89 \pm 0,23$ | $0,62 \pm 0,060$ | $0,95 \pm 0,100$ | $44,3 \pm 2,85$ |
| 0,14 | $2,39 \pm 0,15$ | $3,25 \pm 0,41$ | $0,74 \pm 0,182$ | $1,08 \pm 0,193$ | $54,6 \pm 3,93$ |
| 0,32 | $1,42 \pm 0,11$ | $2,77 \pm 0,15$ | $0,60 \pm 0,065$ | $0,92 \pm 0,069$ | $55,9 \pm 5,78$ |
| 0,42 | $1,14 \pm 0,11$ | $2,34 \pm 0,24$ | $0,52 \pm 0,060$ | $0,79 \pm 0,141$ | $54,7 \pm 5,57$ |

Крім того, спостерігається зміна і стабілізація відносного вмісту фотосинтетичних пігментів і білка у зв'язку зі зміненими умовами по мінеральному забезпеченню і освітленості (на фоні зміни щільності культури) (Фіг. 2, Фіг. 3, табл. 2).

Загальний вихід біомаси *D. salina* при квазібезперервному культивуванні складається з щоденних 10-40 % відборів біомаси і біомаси, яка збирається з культиваторів після завершення технологічного циклу. Дані, що характеризують продуктивність культури *D. salina* по біомасі, пігментам та білку при квазібезперервному режимі культивування представлені в табл. 3.

Таблиця 3.

Продуктивність культури *Dunaliella salina* по біомасі, пігментах і білку при квазібезперервному режимі культивування.

| Питома швидкість потоку, доби^{-1} | Продуктивність | | | | |
|---|---|--|--|---|---|
| | біомаса, $\text{г ОР} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{доба}^{-1}$ | хл а, $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{доба}^{-1}$ | хл b, $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{доба}^{-1}$ | каротиноїди, $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{доба}^{-1}$ | білок, $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{доба}^{-1}$ |
| 0,12 | $0,35 \pm 0,011$ | $9,61 \pm 0,690$ | $2,20 \pm 0,205$ | $3,17 \pm 0,235$ | $157,9 \pm 10,11$ |
| 0,14 | $0,33 \pm 0,009$ | $10,82 \pm 0,691$ | $2,48 \pm 0,217$ | $3,43 \pm 0,372$ | $181,8 \pm 13,09$ |
| 0,32 | $0,46 \pm 0,024$ | $12,42 \pm 0,626$ | $2,72 \pm 0,218$ | $4,15 \pm 0,379$ | $252,7 \pm 23,46$ |
| 0,42 | $0,48 \pm 0,036$ | $11,22 \pm 1,022$ | $2,39 \pm 0,245$ | $3,96 \pm 0,295$ | $263,5 \pm 24,42$ |

Щоденне внесення нітратів і фосфатів забезпечує підтримку клітин в культурі у вегетативному стані. У запропонованому способі культивування величина швидкості потоку знаходиться в діапазоні $0,1-0,4 \text{ доби}^{-1}$, але за результатами проведених експериментів найбільша продуктивність по пігментах та білку зареєстрована при питомій швидкості потоку поживного середовища близько $0,3 \text{ доби}^{-1}$ (щоденний 30 % обмін середовища). У цьому випадку продуктивність культури *D. salina* по біомасі складає $0,45 \text{ г ОР} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{доба}^{-1}$, по хлорофілу а - 12, каротиноїдах - 4, а білку - $250 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{доба}^{-1}$.

Приклад.

Для культивування використовували штам IBSS-2, який характеризується більш високим вмістом каротиноїдів у клітинах, у порівнянні зі штамми IBSS-1 і IBSS-3.

Для отримання інокуляту штам протягом 7 діб вирощували методом накопичувальної культури в культиваторах плоскопаралельного типу об'ємом 6 л з робочою товщиною шару 5 см при поверхневому освітленні $80 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ на модифікованому поживному середовищі Тренкеншу. Отриману культуру використовували як інокулят. Культуру переносили в аналогічні культиватори зі свіжим модифікованим поживним середовищем Тренкеншу і продовжували

виросувати протягом 10 діб при тих же умовах, при безперервному барботажі газоповітряної сумішшю зі швидкістю 1 л суміші·хв⁻¹·л⁻¹ культури, що містить 3 % CO₂ і температурі 26-28 °С до щільності культури 1,5-3 г ОР·л⁻¹·доба⁻¹.

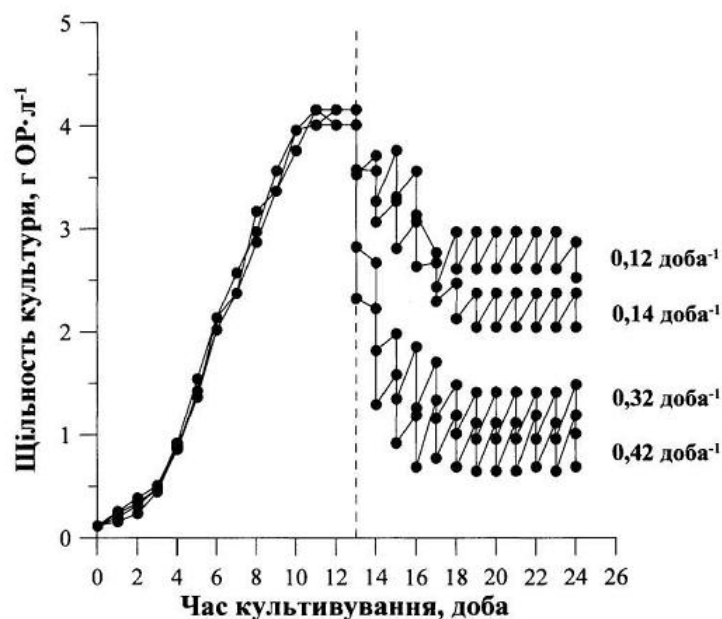
- Далі культивування *D. salina* проводили в квазібезперервному режимі в 6-літрових культиваторах на модифікованому поживному середовищі Тренкеншу при цілодобовій поверхневій освітленості 80 Вт·м⁻², швидкості продування газоповітряної сумішшю 1 л суміші·хв⁻¹·л⁻¹ культури, яка містить 3 % CO₂ і температурі 26-28 °С. Об'єм культури в культиваторах становив 5 л, початкова щільність культури - близько 0,12 г ОР·л⁻¹. Кожні 24 години з культиваторів відбирали близько 30 % обсягу культури ($\omega = 0,30$ доба⁻¹) і замінювали його рівноцінним об'ємом свіжого поживного середовища. Отримана біомаса становила близько 0,5 г ОР з 1 л культури в добу з відносним вмістом каротиноїдів у біомасі не менше 0,9 % ОР, хлорофілу а - 2,8 % ОР і білку - 55 % ОР.

- У запропонованому способі продуктивність по біомасі в 25 разів вище, ніж у відомому. Спосіб ефективний і може бути покладений в основу промислового культивування одноклітинної зеленої водорості *Dunaliella salina* та отримання сировини для виробництва БАД з підвищеною біодоступністю каротиноїдів і хлорофілів як біологічно активних сполук.

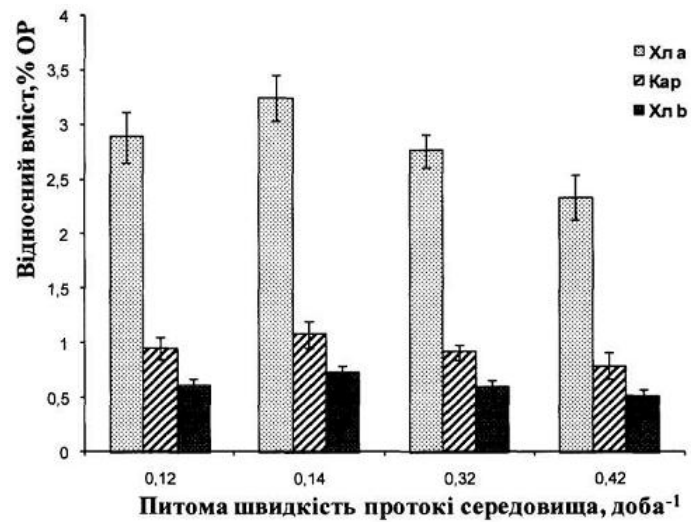
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- Спосіб культивування одноклітинної зеленої мікроводорості *Dunaliella salina* для отримання біомаси, у якому використовують квазібезперервний режим культивування, який **відрізняється** тим, що культуру, вирощену на модифікованому поживному середовищі Тренкеншу методом накопичувальних культур до щільності 1,5-3 г ОР·л⁻¹, переводять у квазібезперервний режим культивування та здійснюють подальше вирощування при питомій швидкості потоку середовища близько 0,3 добу⁻¹, при цілодобовому освітленні з поверхневою освітленістю 80 Вт·м⁻², безперервній продувці газоповітряною сумішшю зі швидкістю 1 л суміші·хв⁻¹·л⁻¹ культури, яка містить 3 % CO₂, і температурі 26-28 °С, на модифікованому поживному середовищі Тренкеншу, яке має склад, г·л⁻¹:

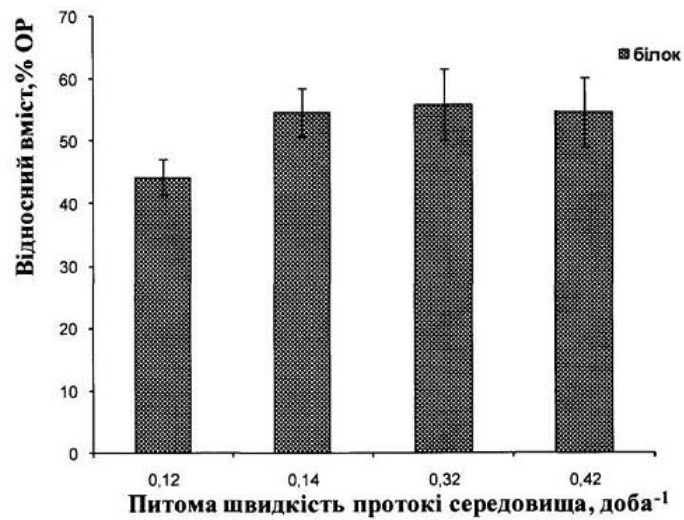
| | |
|--|---------|
| морська сіль | 120 |
| NaNO ₃ | 2,139 |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 0,30 |
| Na ₂ EDTA | 0,037 |
| FeC ₆ H ₅ O ₇ ·7H ₂ O | 0,042 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0,0040 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0,0031 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O | 0,0009 |
| K ₂ Cr ₂ (SO ₄) ₄ ·24H ₂ O | 0,0017. |



Фіг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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