



УКРАЇНА

(19) UA (11) 10253 (13) C2

(51) 7 C12N1/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ СИНЬОЗЕЛЕНОЇ ВОДОРОСЛІ SPIRULINA PLATENSIS (NORDST) GEITL

(21) 95114969

(22) 23.11.1995

(24) 15.05.2001

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

(72) Будзай Іван Гнатович, Стахорський Ігор Євгенович, Шнюкова Єлизавета Іллівна, Мушак Петро Олексійович, Пилипенко Леонід Іванович, Архипова Валентина Іванівна

(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ МІЖГАЛУЗЕВА ВИРОБНИЧО-КОМЕРЦІЙНА ФІРМА "СПИРУЛИНА ЛТД"

(56) Thesis presentees a la faculte des sciences de l'universite de Paris. – 1966. – 85 p.

(57) Способ культивирования синезеленой водоросли *Spirulina platensis* (Nordst) Geitl, предусматривающий барботирование суспензии водорослей в водной питательной среде, содержащей гидрокарбонат натрия и микроэлементы, при периодических отборе биомассы и подпитке питательной средой, отличающийся тем, что барботирование осуществляют смесью воздуха и диоксида углерода, при этом используют питательную среду, приготовленную на родниковой воде и содержащую 8 - 16,8 г/л гидрокарбоната натрия и до 50 мас.% культуральной жидкости, полученной после отбора биомассы.

Изобретение относится к прикладной альгологии и может быть использовано при культивировании синезеленой микроводоросли *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl., являющейся перспективным объектом биотехнологии как богатый источник белка, ряда важнейших физиологически активных веществ и использующейся в качестве пищевой и кормовой добавки, а также для получения высокоэффективных фармацевтических препаратов и др.

Спирулина накапливает 45–60% белка, который содержит все незаменимые аминокислоты. Она синтезирует 10–20% углеводов, до 10% липидов, ненасыщенные жирные кислоты, широкий спектр витаминов, в том числе никотиновую кислоту, тиамин, пиридоксин, биотин, рибофлавин, β-каротин и др. Биомасса спирулины содержит такие высокоценные уникальные соединения как фикоцианин, гликозиды ксантофиллов, γ-линоленовую кислоту.

*Spirulina platensis* является термофильной водорослью, распространенной и культивируемой в тропических регионах Африки и Мексики и адаптирована к интенсивной солнечной радиации и высокой температуре (30–35°C) [1–3].

Известны способы выращивания *Spirulina platensis* в открытых бассейнах [4, 5] и в установках закрытого типа [5–9]. Технология получения биомассы *Spirulina platensis* предусматривает барботацию суспензии водорослей, изъятие биомассы, ее сгущение и высушивание. При использова-

нии установок открытого типа сбор урожая производится, как правило, механически путем изъятия поверхностного слоя суспензии [5].

Известен способ культивирования *Spirulina platensis* с использованием морской воды как компонента питательной среды [10]. Было предложено также выращивание *Spirulina platensis* на среде, включающей 30% морской воды, бикарбонат натрия, диаммоний фосфат и селитру [11]. Недостатком способа является тот факт, что он может быть рационально применен лишь в прибрежной морской зоне.

Описан способ оптимизации питательной среды для культивирования *Spirulina platensis*, основанный на использовании минеральных удобрений. Однако предлагаемый вариант не привел к повышению продуктивности водорослей из-за несбалансированности компонентов среды [12]. В то же время система выращивания *Spirulina platensis* в штате Флорида (США) с использованием питательных веществ из сточных вод, а также навоза, разведенного в воде, дала хорошие результаты [13]. Однако такой способ, исходя из состава предлагаемых компонентов среды, может иметь только локальное применение.

Известен способ использования стерильного фильтрата культуральной жидкости *Spirulina platensis*, полученного через мембранные фильтры, для повторного культивирования водорослей. Однако существенным недостатком данного способа является применение трудоемких приемов

получения фильтрата, удорожающих технологию получения биомассы [14].

Запатентован способ получения биомассы спирулины с повышенным содержанием фтора, которая может быть использована как сырье для фармацевтических средств, обогащенных фтором. Способ предусматривает культивирование водорослей на среде, содержащей фтористые соединения. Биомасса может быть использована в узком диапазоне – для профилактики кариеса зубов лиц, проживающих в районах, где употребляется питьевая вода с содержанием фтора менее 1 мг/л [15].

Наиболее близким, прототипом предлагаемому нами способу культивирования является описанный в литературе способ [16] выращивания спирулины на минеральной среде, приготовленной на дистиллированной воде с высокой концентрацией бикарбоната натрия – 16,8 г/л, с использованием большого набора дорогостоящих и малодоступных микроэлементов следующего состава:

Среда Заррука, г/л:

NaHCO <sub>3</sub>	16,8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
NaCl	1,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,04
FeSO <sub>4</sub> ·x	0,01
ЭДТА (этилендиаминтетра- ацетат)	0,08
Раствор микроэлементов I	1 мл
Раствор микроэлементов II	1 мл
Растворы микроэлементов, г/л:	
Раствор I:	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,81
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,22
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,08
MoO <sub>3</sub>	0,015
Раствор II:	
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,023
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> ·24H <sub>2</sub> O	0,096
Ni(SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,048
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,018
Ti <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,040
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,044
pH среды	8,5–9,0

Цель нашего изобретения – упрощение и удешевление способа культивирования синезеленой водоросли *Spirulina platensis*. Это осуществляется за счет уменьшения концентрации основного компонента питательной среды – бикарбоната натрия при барботировании суспензии воздухом, обогащенным углекислотой, за счет использования при широкомасштабном культивировании родниковой воды, получаемой на месте выращивания водорослей, что позволяет исключить применение растворов дорогостоящих микроэлементов, повторного использования питательной среды после сепарирования водорослей в сочетании со свежеприготовленным питательным раствором.

Сущность способа заключается в следующем.

Выращивание спирулины производится на питательной среде с уменьшенным по сравнению

с прототипом количеством бикарбоната натрия с 16,8 г/л до 8,0–10,0 г/л, т.е. на – 52,4–40,5% соответственно.

Состав ингредиентов предлагаемой среды следующий, г/л:

NaHCO <sub>3</sub>	8,0–10,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
NaCl	1,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,04
pH	8,5–9,0

Водоросли выращивают на питательной минеральной среде, приготовленной на родниковой воде, получаемой на месте массового культивирования спирулины. Это позволяет исключить применение дорогостоящих и малодоступных микроэлементов.

Соотношение инокулята водорослей к питательной среде при посеве составляет 1:5 или 1:6.

Культивирование в лабораторных условиях осуществляется в конических сосудах, а в производственных условиях (в теплицах) – в плоскостных биореакторах, в которых толщина слоя суспензии водорослей составляет 25–30 см. Температура культивирования 20–28°C, освещенность при лабораторном культивировании искусственная люминесцентными лампами дневного света – 3–5 клк, при производственном – в летний период естественная, в зимний – при освещенности люминесцентными лампами 3–5 клк. Процесс культивирования производится при аэрации суспензии водорослей воздухом, обогащенным углекислотой до 2–3%. Это обеспечивает перемешивание и равномерное освещение всех клеток трихомов, способствующее повышению интенсивности процесса фотосинтеза и продуктивности *Spirulina platensis*.

Сбор водорослей производится при достижении стационарной фазы развития, контролируемой путем фотометрического учета плотности суспензии (ежедневно, начиная с 14–18 дней после посева). Биомасса сгущается путем сепарирования, тщательно промывается водой для удаления остатков солей и неприкрепленных микроорганизмов. Минеральная питательная среда после отделения водорослей может быть повторно использована для культивирования водорослей с добавлением свежеприготовленного питательного раствора в соотношении 1:1.

Рекомендуемое соотношение свежеприготовленного питательного раствора и оставшегося после сепарирования водорослей (1:1) является оптимальным в течение трех месяцев культивирования спирулины. Так, опыты показали, что при таком соотношении (1:1) на 16–18 день после посева водорослей, т.е. на период начала регулярного отбора биомассы, плотность суспензии составляла 1,23 г сухой массы в литре. Использование вдвое большего количества отсепарированной питательной среды по отношению к вновь приготовленному раствору (2:1) приводило к менее интенсивному росту спирулины, которая на аналогичный период накапливала 0,78 г/л.

По истечении трехмесячного периода культивирования среда подлежит полной замене.

Сравнение характера роста водорослей, полученных по известному способу (прототип) и по рекомендуемому, показывает, что при использовании предлагаемого способа прирост биомассы спирулины не ниже, а иногда и выше, чем при культивировании по известному методу. Так, лабораторные опыты по выяснению продуктивности спирулины, выращиваемой на полной питательной среде (прототип-контроль) и с использованием рекомендуемого способа (опыт) показали, что по темпам накопления биомассы на начальных этапах культивирования (лаг-фаза) опытные образцы несколько отставали в росте от контроля и составляли 96,2% его биомассы. Начиная с 9-дневного возраста культуры (фаза линейного роста) и до наступления стационарной фазы при использовании рекомендуемого способа накопление биомассы было более интенсивное, чем в контроле, принято за 100%, и составляло по отношению к нему 107–118%.

Продуктивность спирулины, выращиваемой предлагаемым способом в фотоблоках тепличных комплексов в течение года, составляет 7–15 г сухой массы с м<sup>2</sup> за сутки, что находится на уровне аналогичных показателей мировых центров массового культивирования *Spirulina*, а именно 4,1–15,2 г/м<sup>2</sup> за сутки [17].

Следовательно, интенсивность развития водорослей по предложенному способу не ниже, а даже более высокая, чем на стандартной минеральной среде Заррука.

При цене бикарбоната натрия в 150 тыс.крб. за кг предлагаемый способ культивирования спирулины позволяет сэкономить только на уменьшении его дозы с 16,8 до 8,0–10,0 г/л при приготовлении десяти тонн питательной среды 10,20–13,20 млн крб. соответственно. Дополнительная экономия за счет исключения из состава среды микроэлементов не может быть определена из-за отсутствия в системе реализации большинства из них цен на них.

Таким образом, изобретение позволяет сократить расходы компонентов на получение биомассы водорослей, удешевить питательную среду при сохранении высокой производительности спирулины, являющейся ценным пищевым, кормовым и фармацевтическим сырьем.

#### Литература:

1. Wagener Kians, Luca Roberto Angela de. The mass cultivation of *Spirulina platensis* in Brazil // *Hydrobiologia*. – 1987. – 151–152. – P. 69–70.
2. Sironval C. La spiruline, une arme contre la malnutrition, histoire at perspectives // *Bull. Inst. oceanogr.*, Monaco. – 1993. – N Num.spec 12. – p. 203–210.
3. Henrickson R. Earth Food *Spirulina*. How this remarkable blue-green algae can transform your

health and our planet. – Laguna Beach,;1Renore Enterprises. – 1989. – 180 p.

4. Richmond A. Mass production of microalgae: open vs. closed systems // *Sorui-Jap. J. Phycol.* – 1993. – 41, n 4. – P. 390–391.

5. *Spirulina ETTA National Symposium MCRC.* – Madras, India. – 1992. – 130 p.

6. Raymond Lawrence P. Mass algal culture system. Battelle Memorial Institute. Пат. 4320594, США. Заявл. 02.09.80. № 183590, опубл. 23.03.82. МКИ A01 G 7/00, НКИ 47/1.4; 47/59.

7. Аманов Ч.Ф., Байрамов Р.Б., Карпов А.М., Анисимов О.Л., Курбаньязов Ч., Складнев А.А. Установка для выращивания микроводорослей. НПО Солнце ТССР. Всес. н.-и. биотехн. ин-т. Ас. 959697, СССР. Заявл. 25.06.81. № 3311725/30–15, опубл. в Б.И., 1982, № 35. МКИ A01 G 31/02.

8. Мирзаев В.М., Тихонов Ю.П., Султанов А.Я., Джалалов З. Установка для производства микроводорослей. Ташк. с.-х ин-т. Ас. 1053791А, СССР. Заявл. 04.06.81, № 3296440/30–15, опубл. в Б.И., 1983, № 42.

9. Tredici M.R., Chini Zittelli G., Biagiolini S., Materassi R. Novel photobioreactors for the mass cultivation of *Spirulina spp.* // *Bull. Inst. oceanogr.*, Monaco. – 1993. – N Num.spec 12. – p. 89–96.

10. Que faire pour les enfants du Monde ? – Association Pour Combattre la Malnutrition Par Algoculture Simplifiee, Le Senat, 22 Mai, 1995, 4 p.

11. Valderrama G., Cardenas A., Markovits A. On the economics of *Spirulina* production in Chile with details on dragboard mixing in shallow ponds // *Hydrobiologia*. – 1987. – 151–152. – P. 71–74.

12. Densilov L.A., Rudic V.F. Optimizarea mediului nitritiv pentru cultura spirulinei // *An. Sti. Univ. Iasi. Biol.* – 1991. – 37. – P. 91–94.

13. Lincoln Edward P., Crawford James J.W., Wilkie Ann C. *Spirulina* in animal agriculture // *Bull. Inst. oceanogr.*, Monaco. – 1993. – N Num. spec 12. – p. 109–115.

14. Fatma Tasneem. Effect of culture filtrate on growth of *Spirulina platensis* // *Curr. Sci. (India)*. 1990. – 59, N 6. – P. 797–798.

15. Рудик В.Ф., Гуля А.П., Кокунов Ю.В. Способ получения биомассы спирулины. Ин-т микробиол. АН Молд.ССР. Ас. 1620477 А1, СССР. Заявл. 12.05.88., № 4426871/30–13, опубл. в Б.И., 1991, № 2.

16. Zarrouk C. Contribution al l'etude cyanophyceae influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch. et Gardner) Geitler // *Thesis presentees a la faculte des sciences de l'universite de Paris.* – 1966. – 85 p.

17. Seshadri C.V. Large scale production systems // *Spirulina ETTA National Symposium MCRC*, Madras, India, 1992, p. 22–26.

Тираж 50 экз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03

