



УКРАЇНА

(19) UA (11) 87245 (13) C2
(51) МПК (2009)
A01G 33/00
C12N 1/12
C12R 1/89 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ОДНОКЛІТИННОЇ ЗЕЛЕНОЇ ВОДОРОСТІ НАЕМАТОСОCCUS PLUVIALIS
ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ АСТАКСАНТИНУ**

1

(21) а200806137
(22) 12.05.2008
(24) 25.06.2009
(46) 25.06.2009, Бюл.№ 12, 2009 р.
(72) МІНЮК ГАЛИНА СЕМЕНІВНА, ТЕРЕНТ'ЄВА
НАТАЛЯ ВІКТОРІВНА, ДРОБЕЦЬКА ІРИНА ВІК-
ТОРІВНА, ЧУБЧИКОВА ІРИНА МИКОЛАЇВНА
(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ПІВДЕННИХ МОРИВ ІМ.
О.О. КОВАЛЕВСЬКОГО НАН УКРАЇНИ
(56) EP A1 1724357, 22.11.2002.
EP A1 1760157, 05.09.2006.
EP A1 1749890, 07.02.2007.
JP A 3163127, 15.07.1991.
Fabregas J., Dominguez A., Regueiro M., Maseda.,
Otero A. Optimization of culture medium for the
continuous cultivation of the microalga
Haematococcus pluvialis II Appl. Microbiol.
Biotechnol. - 2000. - 53. - P. 530-535.
MD G2 1946, 30.06.2002.
MD G2 1866, 28.02.2002.
MD G2 1723, 31.08.2001.
WO A1 9728274, 07.08.1997.
Del Rio E., Acien F.G., Garcia-Malea M.C., Rivas J.,
Molina-Grima E., Guerrero M.G. Efficient one-step
production of astaxanthin by the microalga
Haematococcus pluvialis in continuous culture //
Biotechnol. Bioeng. - 2005. - 91, №. 7. - P. 808-815.
(57) Спосіб культивування одноклітинної зеленої
водорості Haematococcus pluvialis для одержання
астаксантину, що передбачає індукцію біосинтезу
астаксантину в монадних вегетативних клітинах,
який **відрізняється** тим, що культуру, яку вирос-

2

тили на поживному середовищі МОНМ-1, у стані
субстратного насичення клітин по біогенних еле-
ментах (інокулят) вносять у кількості $0,3-0,35 \cdot 10^7$
кл.л⁻¹ у поживне середовище МОНМ-2, що відрі-
зняється від середовища МОНМ-1 30-кратно зни-
женням вмістом азоту ($0,2 \text{ мМ} \cdot \text{л}^{-1}$) і фосфору ($0,12$
 $\text{мМ} \cdot \text{л}^{-1}$), однократно вносять 15 мМ ацетату натрію
і подальше вирощування протягом 20 діб здійс-
нюють в напівпроточному режимі ($0,1-0,3 \text{ доб}^{-1}$),
підтримуючи в середовищі МОНМ-2 заданий рі-
вень азоту і фосфору, при цілодобовому освітлен-
ні люмінесцентними лампами денного світла з
інтенсивністю світлового потоку $120 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, без-
перервній продувці повітрям ($0,3 \text{ л} \cdot \text{хв}^{-1}$) і темпера-
турі $22-26 \text{ }^\circ\text{C}$, а модифіковане середовище МОНМ-
1 має такий склад, мг.л⁻¹:

KNO ₃	615
CaCl ₂ ·2H ₂ O	55,45
Fe ₆ H ₅ O ₇ ·5H ₂ O	2,62
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,5
Na ₂ HPO ₄	45,0
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,85
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,07
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,012
Na ₂ Mo ₄ ·2H ₂ O	0,12
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,011
KCr(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0,499
Na ₂ Se ₃	0,008
Біотин	0,025
Вітамін В ₁	0,0175
Вітамін В ₁₂	0,015.

Передбачуваний винахід відноситься до біоте-
хнології мікроводоростей і може бути використа-
ний для промислового одержання природного ас-
таксантину з мікроводорості Haematococcus
pluvialis.

Кетокаротиноїд атаксантин (3,3'-дігідрокси-
4,4'-дікетто-β-каротин) є високо цінною біологічно

активною речовиною, що проявляє властивості
імуностимулятора, УФ- і радіопротектора, антика-
нцерогена, регулятора діяльності нервової, серце-
во-судинної й ендокринної систем людини й тва-
рин. Поліфункціональність фізіологічної дії
астаксантину визначається його високою антиок-
сидантною (АО) активністю, що перевищує в сис-

(19) UA (11) 87245 (13) C2

темах *in vivo* АО-активність β -каротину й α -токоферолу на порядок. Найбільш перспективним промисловим джерелом природного астаксантину є зелена мікроводорість *Haematococcus pluvialis*, у клітинах якої вміст пігменту може досягати 2-3% сухої речовини (СР). При цьому АО-активність астаксантину, що продукується водорістю, істотно вище активності синтетичного аналога, завдяки перевазі в складі ізомерів природної форми 3S,3'S-ізомера.

Двостадійні промислові технології одержання астаксантину з *H. pluvialis*, які використовують у теперішній час, передбачають такий спосіб культивування водорості, при якому процеси росту й біосинтезу вторинних каротиноїдів пристосовані до різних стадій клітинного циклу (вегетативної й спорогенезу) [див. Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response // *Physiol. Plant.* - 2000. - 108. - Р. 111-111]. На першій («зеленій») стадії технологічного процесу водорість вирощують у контрольованих умовах, що забезпечують максимальну швидкість ділення вегетативних клітин. На другій («червоній») стадії, що починається з моменту досягнення культурами стаціонарної фази росту, отриману біомасу переносять в умови, що ініціюють утворення апланоспор і накопичення в них астаксантину. Трансформацію вегетативних клітин в апланоспори й індукцію в останніх вторинного каротиногенезу викликають різними видами стрес-впливу на культури: збільшенням освітленості й температури, дефіцитом біогенних елементів або додаванням у середовище різних хімічних сполук - активаторів вільно-радикального окислювання [див. WO 97/28274, WO 2005/116238, EP 1760157, JP 3163127, EP 1724357]. У результаті стрес-впливу монадні еліпсоїдні клітини здобувають спочатку пальмелоїдну структуру (втрачають джгутики, округляються й збільшуються в розмірах), а потім утворюють апланоспори, оточені багат шаровою, стійкою до хімічного впливу (лужного й кислотного гідролізу) оболонкою, яка утворена целюлозою й біополімером альгенаном, аналогічним за структурою спорополленіну, і тому важко руйнується механічними методами. Дозрівання апланоспор супроводжується інтенсивним накопиченням моно- і діефірів астаксантину в ліпідних включеннях цитоплазми. Тривалість другої стадії культивування, вихід астаксантину з літра культури і його вміст у біомасі варіюють залежно від методів індукції вторинного каротиногенезу.

Відомі двостадійні технології культивування *H. pluvialis* характеризуються рядом недоліків, що визначають високу собівартість одержання астаксантину з *H. pluvialis* й обмежують безпосереднє застосування одержуваної біомаси для виробництва БАД, продуктів харчування й кормових добавок. Найбільш істотні з них полягають у наступному:

1. Наявність у апланоспор міцних оболонок істотно утрудняє екстракцію астаксантину з біомаси при його одержанні в чистому виді і обумовлює низьку біодоступність каротиноїду для людини й ссавців при безпосередньому уживанні біомаси в їжу через відсутність у їхньому шлунково-кишковому тракті ферментів, що гідролізують кліт-

ковину й альгенан. Ці обставини вимагають застосування комбінацій спеціальних енергоємних методів дезінтеграції клітин (здрібнювання біомаси до часток розміром менш 5-8мкм) і приводять до використання коштовного й енергоємного устаткування (кульові млини, ультразвукові дезінтегратори, преси й т.п.).

2. Індукція утворення апланоспор і накопичення в них астаксантину за допомогою методів стрес-впливу на культури, що використовуються у теперішній час, викликає значні втрати біомаси, отриманої на I етапі, через масову загибель вегетативних клітин (до 40-60%), що приводить до непродуктивних витрат на мінеральні солі, електроенергію й технічне обслуговування культиваторів.

3. Ще одним недоліком, що вимагає додаткових капіталовкладень, є агрегація пальмелоїдних клітин на початковому етапі другої стадії й осідання їх на стінках культиваторів, що приводить до зниження інтенсивності світлового потоку, що проникає у внутрішній шар культури. Це явище вимагає використання ерліфтів або потужних мембранних насосів для збільшення швидкості турбулентного потоку в культиваторах, а також обов'язкового чищення культиваторів перед кожним технологічним циклом (обробкою гарячою парою під високим тиском).

Відомий спосіб одностадійного культивування *H. pluvialis*, при якому ділення клітин і накопичування в них астаксантину відбуваються на одній (вегетативній) стадії клітинного циклу [див. Del Rio E., Acien F.G., Garcia-Malea M.C., Rivas J., Molina-Grima E., Guerrero M.G. Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture // *Biotechnol. Bioeng.* - 2005. - 91, №7. - Р. 808-815]. Перевага способу полягає в тому, що вегетативні монадні клітини, збагачені астаксантином, не мають міцної альгенанової оболонки, завдяки чому підвищується біодоступність каротиноїду, знижуються витрати на здрібнювання біомаси й збільшується вихід астаксантину при його одержанні в чистому виді. Водорість вирощують автотрофно методом безперервної культури на поживному середовищі зі зниженим вмістом азоту (1,7мМ) при штучному освітленні люмінесцентними лампами з інтенсивністю світлового потоку в $1220 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ і швидкості потоку середовища (ω), що дорівнює $0,9 \cdot \text{доб}^{-1}$. Одержувана таким чином біомаса на 95% складається з монадних і пальмелоїдних вегетативних клітин і на 5% - із апланоспор. Найбільш раціональним методом збирання біомаси в цьому випадку є центрифугування. Вміст сухої речовини в літрі культури становить 0,7г, вміст астаксантину в біомасі - 0,8% СР.

Зазначена робота має принципове значення, тому що підтверджує можливість одержання біомаси *H. pluvialis*, що складається з вегетативних клітин, збагачених астаксантином. Однак запропонований режим культивування має істотні обмеження для використання в промислових масштабах. Найбільш важливими з них є:

а) високі витрати електроенергії на створення світлового потоку інтенсивністю $1220 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ і щоденне збирання біомаси за допомогою центрифугування (90% всього об'єму культури);

б) суттєво більш низький вміст астаксантину в сухій речовині (0,7% СР), у порівнянні з варіантами двостадійного методу культивування водорості, що використовуються в теперішній час (2-2,5% СВ);

Крім того, у роботі відсутні відомості про тривалість стаціонарної фази росту культур (тобто тривалості технологічного циклу) і всі дані, що характеризують продуктивність культур по біомасі й астаксантину, наведеш для 5 доби культивування. Відсутні також і відомості про співвідношення монадних і пальмелоїдних клітин в одержуваній біомасі, що мають важливе значення для оцінки її біодоступності, тому що оболонки пальмел, так само як й оболонки апланоспор, містять альгенан.

В основу винаходу Спосіб культивування одноклітинної зеленої водорості *Haematococcus pluvialis* поставлено задачу підвищити ефективність одностадійного способу культивування *H. pluvialis* шляхом зниження витрат на виробництво біомаси й підвищення її біологічної цінності (біодоступності й вмісту астаксантину).

Спосіб культивування одноклітинної зеленої водорості *Haematococcus pluvialis* для одержання астаксантину заснований на методі індукції біосинтезу астаксантину в монадних вегетативних клітинах, а його модифікація й підбір умов культивування, що виключають утворення апланоспор і забезпечують перевагу в культурах рухливих клітин над пальмелоїдними (більше 80%) протягом 20-ти денного технологічного циклу й накопичення в них астаксантину до рівня його звичайного вмісту в апланоспорах (не менш 2% СР), були виконані авторами в лабораторних експериментах.

Поставлене завдання досягається тим, що культуру, що було вирощено на поживному середовищі МОНМ-1, у стані субстратного насичення клітин по біогенних елементах вносять у кількості $0,3-0,35 \cdot 10^7 \text{ кл} \cdot \text{л}^{-1}$ в поживне середовище МОНМ-2, що відрізняється від середовища МОНМ-1 30-кратно зниженим вмістом азоту ($0,2 \text{ мМ} \cdot \text{л}^{-1}$) і фосфору ($0,12 \text{ мМ} \cdot \text{л}^{-1}$). До середовища однократно додають 15 мМ ацетату натрію. Вирощування протягом 20 діб здійснюють у натвпроточному режимі ($0,1-0,3 \text{ сут}^{-1}$), підтримуючи в середовищі МОНМ-2 заданий рівень азоту й фосфору, при цілодобовому освітленні люмінесцентними лампами денного світла з інтенсивністю світлового потоку $120 \text{ мЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, безперервній продувці повітрям ($0,3 \text{ л} \cdot \text{хв}^{-1}$) і температурі $22-26^\circ \text{C}$.

Спільним для прототипу й способу, що заявляється, є індукція біосинтезу астаксантину в монадних клітинах. На відміну від прототипу, в якому індукція біосинтезу астаксантину здійснюється зниженням концентрації у середовищі тільки азоту до $1,7 \text{ мМ} \cdot \text{л}^{-1}$ й різким збільшенням освітленості до $1220 \text{ мЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, у способі, що заявляється, проводиться одночасно різке зниження концентрації азоту і фосфору до $0,2 \text{ мМ} \cdot \text{л}^{-1}$ і $0,01 \text{ мМ} \cdot \text{л}^{-1}$ у поєднанні з однократним додаванням ацетату натрію (для збільшення молярного співвідношення С/Н до 150) без суттєвого збільшення освітленості. Крім того, в прототипі використовується метод безперервної культури зі швидкістю потоку $0,1-0,3 \text{ сут}^{-1}$.

Передбачуваний винахід пояснюється ілюстраціями. Фіг.1 - Динаміка вмісту сумарних каротиноїдів й астаксантину в культурах і клітинах *H. pluvialis* залежно від швидкості потоку поживного середовища. Фіг.2 - Вміст каротиноїдів (а) і астаксантину (б, в) у сухій біомасі залежно від швидкості потоку поживного середовища. Фіг.3 - Середня питома швидкість росту культур при різній швидкості потоку середовища. Фіг.4 - Динаміка чисельності пальмелоїдних клітин у культурах при різній швидкості потоку середовища. Фіг.5 - Вихід сумарних каротиноїдів (а) і астаксантину (б) з літра культури за 20-денний технологічний цикл в умовах одностадійної напівпроточної культури. Фіг.6 - Динаміка біомаси в культурах *H. pluvialis* (штам IBSS-18) при різній швидкості потоку середовища. Фіг.7 - Вихід сумарних каротиноїдів й астаксантину з літра культури в умовах двостадійної культури.

Спосіб культивування одноклітинної зеленої водорості *Haematococcus pluvialis* реалізується в таким чином:

Для культивування може бути використаний будь-який штам *Haematococcus pluvialis*, наприклад CALU-79, CALU 333, CAUP G1002, CCAP 34/1D, CCAP 213/4, SAG 34-1d, SAG 213-4, UTEX 113, IBSS-18 при перевазі крупноклітинних штамів. Їх колекційне зберігання здійснюють на агаризованому (1,5%) базовому середовищі ОНМ (табл. 1) при освітленості $1000-1500 \text{ Лк}$, і температурі $15-18^\circ \text{C}$ із пересіванням кожні 1,5-2 місяця.

Склад поживних середовищ для різних стадій культивування *H. pluvialis*

Таблиця 1

Компонент середовища	Вміст, мг·л ⁻¹			
	ОНМ**	Модифікації середовища ОНМ		
		ОНМ базова (для зберігання штамів й I стадії одержання інокуляту)	МОНМ-1 (для II стадії одержання інокуляту)	МОНМ-2 (для напівпроточного культивування)
KNO ₃	410	410	615	20,2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	110,9	110,9	55,45	55,45
Fe ₆ H ₅ O ₇ ·5H ₂ O	2,62	2,62	2,62	2,62
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,5	246,5	246,5	246,5
Na ₂ HPO ₄	30	30	45	1,42
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,85	0,85	0,85	0,85
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,07	0,07	0,07
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,012	0,012	0,012	0,012
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,12	0,12	0,12	0,12
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,011	0,011	0,011	0,011
Cr ₂ O ₃	0,076	-	-	-
KCr(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	-	0,499	0,499	0,499
Se ₂	0,005	-	-	-
Na ₂ Se ₃	-	0,008	0,08	0,008
Біотин	0,025	0,025	0,025	0,025
Вітамін В ₁	0,0175	0,0175	0,0175	0,0175
Вітамін В ₁₂	0,015	0,015	0,015	0,015

Примітка: ** - [див. Fabregas J., Dominguez A., Regueiro M., Maseda., Otero A. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2000. - 53. - P. 530-535]

Одержання інокуляту. Для одержання інокуляту водорість із агаризованих косяків переносять у рідке стерильне базове середовище ОНМ і 5-7 днів вирощують методом накопичувальної культури при розсіяному природному світлі. Потім культуру переносять у середовище МОНМ-1 (див. табл. 1) і продовжують культивувати при штучному освітленні люмінесцентними лампами денного світла (50-60 мкЕ·м⁻²·с⁻¹ 16 год світло: 8 год темрява) в накопичувальному режимі при безперервному барботажі повітрям зі швидкістю 0,1-0,2 л·хв⁻¹. Для засіву культиваторів використовують культуру, клітини якої мають монадну структуру, при залишковому вмісті азоту і фосфору у середовищі МОНМ-1 не нижче 40% вихідного рівня. Суспензію клітин концентрують і вносять до культиваторів із такого розрахунку, щоб початкова чисельність клітин становила 3-3,5·10⁸ кл·л⁻¹ або 0,3-0,4 г·л⁻¹ сухої речовини.

Процес культивування. Поживним середовищем для запропонованого способу культивування є середовище МОНМ-2, у яке однократно відразу після засіву культиваторів додають ацетат натрію до концентрації 15 мм·л⁻¹. Вирощування водорості здійснюють при безперервному освітленні інтенсивністю 120 мкЕ·м⁻²·с⁻¹, швидкості продувки повітрям 0,2-0,3 л·хв⁻¹ і температурі поживного середовища 22-26°C. З інтервалом в 24 години із культиваторів відбирають 10-30% об'єму культури, замінюючи його рівноцінним об'ємом свіжого середовища та відновлюючи при цьому початковий рівень азоту (0,2 мм·л⁻¹) і фосфору (0,01 мм·л⁻¹).

Створення різкого негативного градієнта концентрацій азоту й фосфору (не менш чим 10-

кратного) у поєднанні зі збільшенням молярного співвідношення С/Н у середовищі до 150 приводить до індукції біосинтезу астаξανтину у вегетативних клітинах *H. pluvialis* при освітленості, яка на порядок нижче, чим у прототипі (Фіг.1).

Вміст астаξανтину в сухій біомасі в процесі культивування збільшується до 2,2-2,8% сухої речовини (Фіг.2б), тобто до рівня, що звичайно реєструють в біомасі агоіаноспор при двостадійному культивуванні *H. pluvialis* - 2-3% СР. Його частка в сумарних каротиноїдах, починаючи з 10-ї доби, становить 70-80% (Фіг.2в).

Щоденне відновлення початкового рівня нітратів і фосфатів забезпечує підтримку клітин у культурах у вегетативному стані. Середня за 20 діб питома швидкість росту астаξανтинпродукуючих культур становить 0,12-0,3 доб⁻¹ (Фіг.3), що практично не відрізняється від швидкості росту автотрофних накопичувальних культур на першій («зеленій») стадії 2-х стадійної технології культивування (0,1-0,35 доб⁻¹). При цьому 80-90% клітин, які містять астаξανтин, протягом періоду не менш 20-ти діб зберігають монадну структуру, а апланоспори в культурах відсутні (Фіг.4).

У запропонованому способі культивування величина швидкості потоку (ω) перебуває в діапазоні 0,1-0,3 доб⁻¹, але найкращою є швидкість 0,2 доб⁻¹ (щоденний 20% обмін середовища). У цьому випадку загальний вихід каротиноїдів й астаξανтину з літра культури за 20 діб культивування вище, ніж у всіх апробованих авторами варіантах, і становить 50 мг·л⁻¹ і 35 мг·л⁻¹, відповідно (Фіг.5 і 7).

8 Приклад.

Для культивування використали штам IBSS-18, виділений авторами у районі м. Адлер в 2003р. Штам характеризується великими розмірами клітин (середня довжина монад становить 33-34мкм) і більш високою швидкістю накопичення астаксантину, у порівнянні з колекційними штамми IPPAS H-239 й CALU-79.

Для одержання інокуляту штам протягом тижня вирощували методом накопичувальної культури в скляних колбах об'ємом 50мл при природному світлі ($30-35\mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) на базовому середовищі ОНМ. Потім культуру концентрували за допомогою центрифугування ($800\text{об}\cdot\text{хв}^{-1}$, 2хв.), переносили до колб більшого об'єму (500мл), які містили 300мл середовища МОНМ-1, і продовжували вирощувати протягом 4-х діб при освітленні люмінесцентними лампами «Feron» DL 20W T4 6400K ($50-60\mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ с фотоперіодом 16год світло:8год темрява) при безперервному барботажі стерильним повітрям зі швидкістю $0,2\text{л}\cdot\text{хв}^{-1}$ і температурі 22-23°C. На 5-ту добу (на логарифмічній фазі росту), коли усі клітини в культурі мали монадну структуру, а залишковий вміст азоту і фосфору в середовищі становив 52,14 і $4,64\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$, відповідно, суспензію клітин концентрували за допомогою центрифугування ($800\text{об}\cdot\text{хв}^{-1}$, 2хв.) і використовували у якості інокуляту.

Культивування *H. pluvialis* для одержання астаксантину проводили в трьох варіантах напівпроточного режиму в 1-літрових конічних колбах на поживному середовищі МОНМ-2 при цілодобовому бічному освітленні з інтенсивністю світлового потоку $120\mu\text{E}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, швидкості продувки повітрям $0,3\text{л}\cdot\text{хв}^{-1}$ і температурі 22-24°C. Об'єм культури в

колбах становив 0,7л, початкова чисельність клітин - $3-3,5\cdot 10^8\text{кл}\cdot\text{л}^{-1}$. Відразу після засіву колб інокулятом у культури внесли по 5,3мл 2М стерильного розчину ацетату натрію. З інтервалом у 24 години із колб відбирали 10, 20 і 30% об'єму культури ($\omega=0,1-0,3\text{сут}^{-1}$) і заміняли його рівноцінним об'ємом свіжого середовища, відновлюючи при цьому початкову концентрацію азоту ($0,2\text{мМ}\cdot\text{л}^{-1}$) і фосфору ($0,01\text{мМ}\cdot\text{л}^{-1}$). Появу астаксантину в клітинах було зареєстровано вже через добу після внесення інокуляту в середовище МОНМ-2 і, починаючи з 10-ої доби культивування, його вміст у розрахунку на клітину стабілізувався й, в залежності від швидкості потоку, становив: а) $27-31\text{пг}\cdot\text{кл}^{-1}$ при $\omega=0,1\text{доб}^{-1}$; б) $36-40\text{пг}\cdot\text{кл}^{-1}$ при $\omega=0,2\text{доб}^{-1}$; в) $30-35\text{пг}\cdot\text{кл}^{-1}$ $\omega=0,3\text{доб}^{-1}$ (Фіг.2). Астаксантинпродукуючі монадні клітини активно ділились протягом усього періоду культивування (Фіг.6). Азот і фосфор, які щодня вносили до середовища під час обміну, повністю утилізувались культурами протягом доби, що було необхідною умовою накопичування астаксантину в клітинах і, одночасно з цим, запобігало непродуктивним витратам мінеральних солей. Загальний вихід біомаси як сировини для одержання астаксантину при напівпроточному культивуванні складався з щоденних 10-30% відборів, а також біомаси, що збирали по закінченні технологічного циклу. Дані, що характеризують вихід каротиноїдів і астаксантину протягом 20-ти добового циклу культивування, вміст каротиноїдів у біомасі на заключній стадії й діапазони чисельності монадних клітин у культурах при різних варіантах потоку середовища представлені в табл. 2.

Таблиця 2

Продукційні й морфологічні характеристики культур в умовах напівпроточного культивування

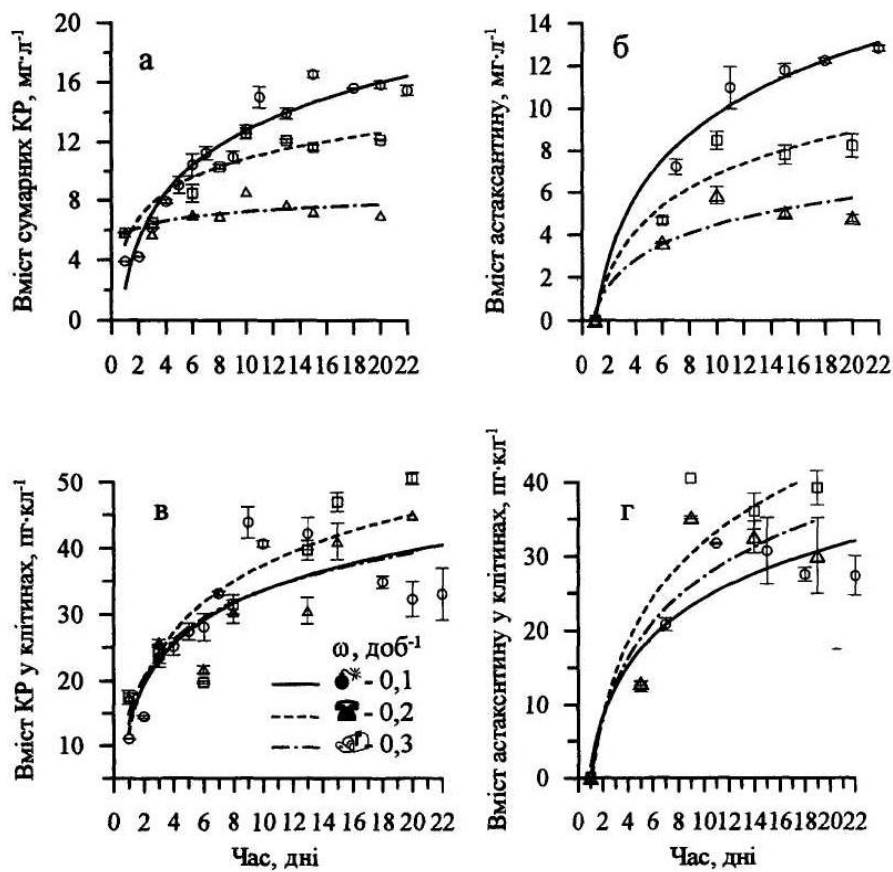
Швидкість потоку середовища, доб^{-1}	Вихід каротиноїдів, $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$		Вміст каротиноїдів у біомасі, % СР		Частка монадних клітин у культурах, %	Вміст апланоспор, %
	сумарні каротиноїди	астаксантин	сумарні каротиноїди	астаксантин		
0,1	$38,14\pm 0,45$	$27,13\pm 0,30$	$2,69\pm 0,11$	$2,3\pm 0,11$	82,8-98,2	0
0,2	$49,72\pm 0,11$	$35,25\pm 0,14$	$3,09\pm 0,18$	$2,7\pm 0,21$	87,7-98,6	0
0,3	$45,62\pm 0,44$	$31,30\pm 0,36$	$3,51\pm 0,15$	$2,5\pm 0,27$	89,3-99,7	0

В умовах двостадійного культивування штаму IBSS-18 при індукції біосинтезу астаксантину стрес-комплексом CH_3COONa (45мМ)+ NaCl (17мМ)+температура 30°C його вміст у зрілих апланоспорах штаму IBSS-18 (розраховуючи на клітину) істотно вище ($120-200\text{пг}\cdot\text{кл}^{-1}$), ніж у монадних клітинах, що одержують при реалізації одностадійного способу культивування, що пропонується. Однак при двостадійному культивуванні максимальний вихід астаксантину з літру культури (з такою ж початковою чисельністю клітин і тривалістю технологічного циклу) у даного штаму у серії експериментів не перевищував $27,5\pm 1,4\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$ через масову загибель клітин у постстресорний період (див. Фіг.7).

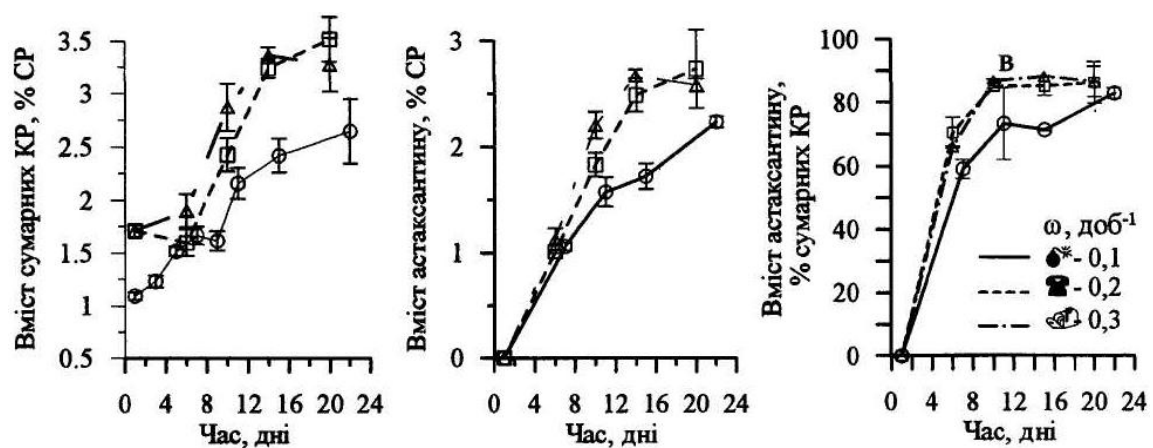
Пропонований спосіб має ряд переваг у порівнянні із прототипом. По-перше, 10-кратна економія електроенергії, що витрачається на освітлення культиваторів, по-друге, 3-9-кратна (залежно від

величини щоденного обміну) економія електроенергії, що витрачається на збирання біомаси, по-третє, відсутність непродуктивних витрат нітратів і фосфатів у процесі напівпроточного культивування, і, нарешті, вміст астаксантину в біомасі за прототипом - 0,8% сухої речовини, а в пропонованому способі - 2,2-2,8% сухої речовини.

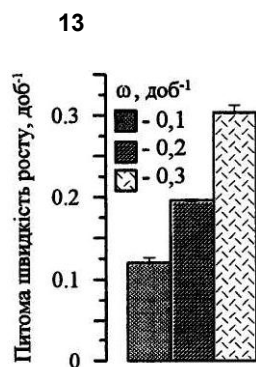
Розроблено економічний й ефективний спосіб, що може бути покладений в основу промислового культивування одноклітинної зеленої водорості *Haematococcus pluvialis*, як сировини для одержання природного астаксантину в чистому виді й БАД з підвищеною біодоступністю каротиноїду. Спосіб виключає трансформацію вегетативних клітин в апланоспори, забезпечує перевагу в культурах клітин монадної структури (>80%) протягом не менш 20 діб і вміст астаксантину в біомасі не менш 2% сухої речовини.



Фиг. 1

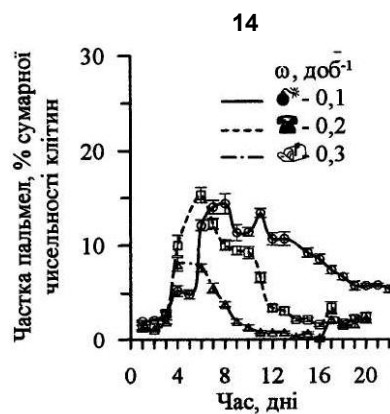


Фиг. 2

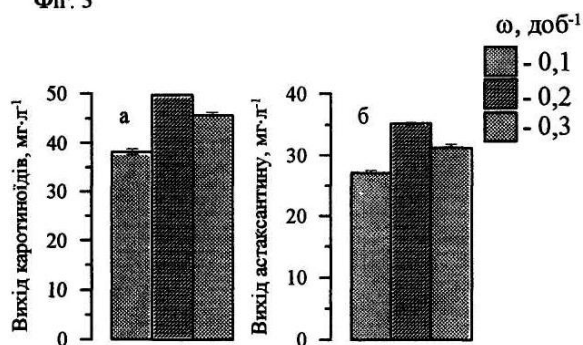


Фіг. 3

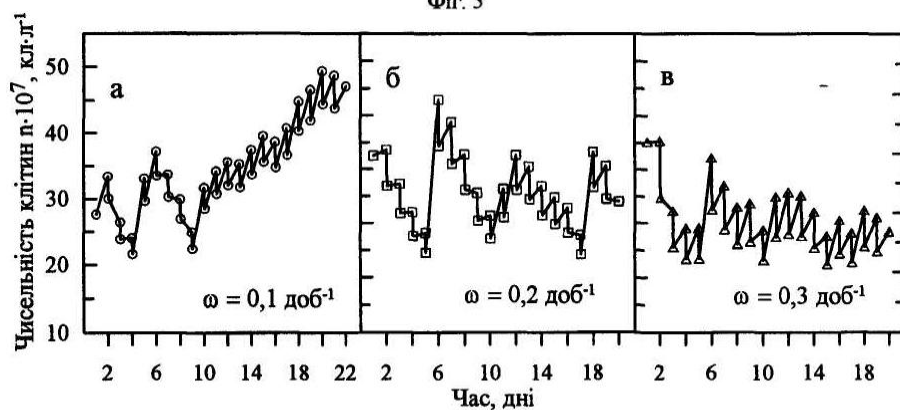
87245



Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

