



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/12 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023128527, 01.11.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.11.2023

Дата регистрации:
19.02.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 01.11.2023

(45) Опубликовано: 19.02.2024 Бюл. № 5

Адрес для переписки:

236016, г. Калининград, ул. А. Невского, 14,
ФГАОУ ВО Балтийский федеральный
университет им. И. Канта, ЦНТИ УНИР,
патентоведу

(72) Автор(ы):

Сухих Станислав Алексеевич (RU),
Бабич Ольга Олеговна (RU),
Каширских Егор Владимирович (RU),
Долганюк Вячеслав Федорович (RU),
Буденкова Екатерина Александровна (RU),
Калашникова Ольга Борисовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Балтийский федеральный
университет имени Иммануила Канта" (БФУ
им. И. Канта) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2292389 C2, 27.01.2007. БАЧУРА
Ю.М., Культивирование цианобактерий родов
апабаена и postoc на различных питательных
средах, Бюллетень науки и практики, Bulletin
of Science and Practice, т. 4., N, 11, 2018, с. 31-38,
<http://www.bulletennauki.com/>. KOMAREK J.,
et al, Modern approach to the classification system
of Cyanophytes 4-Nostocales, (см. прод.)

(54) Способ культивирования цианобактерии рода Amorphonostoc

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к процессу культивирования (получения биомассы) цианобактерий. Основными задачами заявляемого способа культивирования являются: получение биомассы термофильных цианобактерий рода Amorphonostoc, упрощение технологии культивирования, снижение энергетических затрат и наибольший выход полисахаридов. Поставленные задачи решаются тем, что в способе культивирования цианобактерий рода Amorphonostoc, включающем регулирование освещенности, температуры, химического состава субстрата используется питательная среда модифицированного состава

(г/л): KNO₃ - 1,00; K₂HPO₄·3H₂O - 0,262; MgSO₄·7H₂O - 0,20; NaHCO₃ - 0,20; FeSO₄·7H₂O - 0,0249. Раствор микроэлементов (г/л): H₃BO₃ - 2,86; MnCl₂·4H₂O - 1,81; ZnSO₄·7H₂O - 0,22; CuSO₄·5H₂O - 0,08; MoO₃- 0,015; NH₄VO₃- 0,023; K₂Cr₂(SO₄)₄·24H₂O - 0,096; NiSO₄·7H₂O - 0,048; Na₂WO₄·2H₂O - 0,018; Ti₂(SO₄)₃ - 0,040; Co (NO₃)₂·6H₂O - 0,044. Культивирование Amorphonostoc проводят в стерильных условиях, в режиме свет/темнота 12/12 ч, белый свет с интенсивностью 5000 lx, при перемешивании 1 час со скоростью движения ротора 100 об/мин. Продолжительность культивирования составляет

21 сутки при температуре 25°C и рН=6,0. 3 пр.

(56) (продолжение):

Algological Studies, Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes., 1989, p. 247-345.

R U 2 8 1 3 8 0 4 C 1

R U 2 8 1 3 8 0 4 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 1/12 (2023.08)

(21)(22) Application: **2023128527, 01.11.2023**

(24) Effective date for property rights:
01.11.2023

Registration date:
19.02.2024

Priority:

(22) Date of filing: **01.11.2023**

(45) Date of publication: **19.02.2024** Bull. № 5

Mail address:

**236016, g. Kaliningrad, ul. A. Nevskogo, 14,
FGAOU VO Baltijskij federalnyj universitet im.
I. Kanta, TSNTI UNIR, patentovedu**

(72) Inventor(s):

**Sukhikh Stanislav Alekseevich (RU),
Babich Olga Olegovna (RU),
Kashirskikh Egor Vladimirovich (RU),
Dolganyuk Vyacheslav Fedorovich (RU),
Budenkova Ekaterina Aleksandrovna (RU),
Kalashnikova Olga Borisovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Baltijskij federalnyj universitet
imeni Immanuila Kanta" (BFU im. I. Kanta)
(RU)**

(54) **METHOD OF CULTIVATING CYANOBACTERIA OF AMORPHONOSTOC GENUS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the process of cultivating (producing of biomass) of cyanobacteria. The main objectives of the proposed cultivation method are: obtaining biomass of thermophilic cyanobacteria of the genus Amorphonostoc, simplifying cultivation technology, reducing energy costs and the highest yield of polysaccharides. The objectives are solved by the fact that in the method of cultivating cyanobacteria of Amorphonostoc genus including regulation of illumination, temperature, and chemical composition of the substrate, a nutrient medium of modified composition (g/l) is used as follows: KNO₃ - 1,00; K₂HPO₄·3H₂O - 0,262; MgSO₄·7H₂O - 0,20; NaHCO₃

- 0,20; FeSO₄·7H₂O - 0,0249. Microelements solution (g/l): H₃BO₃ - 2,86; MnCl₂·4H₂O - 1,81; ZnSO₄·7H₂O - 0,22; CuSO₄·5H₂O - 0,08; MoO₃- 0,015; NH₄VO₃- 0,023; K₂Cr₂(S0₄)₄·24H₂O - 0,096; NiSO₄·7H₂O - 0,048; Na₂WO₄·2H₂O - 0,018; Ti₂(SO₄)₃ - 0,040; Co (NO₃)₂·6H₂O - 0,044. Cultivation of Amorphonostoc is carried out under sterile conditions, in light/dark mode 12/12 hours, white light with an intensity of 5,000 lx, with stirring for 1 hour at a rotor speed of 100 rpm. The duration of cultivation is 21 days at a temperature of 25°C and pH=6.0.

EFFECT: obtaining a method of cultivating cyanobacteria of amorphonostoc genus.

1 cl, 3 ex

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к процессу культивирования (получения биомассы) цианобактерий.

В последние десятилетия микроводоросли и цианобактерий приобретают все большую актуальность в качестве объекта биотехнологических исследований [Бачура, 2018].

5 Они, имея примитивное строение и отличаясь неприхотливостью к условиям существования, являются первичными продуцентами и характеризуются значительным вкладом в функционирование водных и наземных экосистем. Цианобактерий участвуют в создании органических веществ, способны к азотфиксации, участвуют в накоплении ряда биологически активных веществ (например, полисахаридов), при этом они
10 достаточно быстро накапливают биомассу и отличаются простотой в культивировании [Hamidi, 2019].

Цианобактерий являются ценным сырьем для получения биологически активных веществ (ферментов, полисахаридов, витаминов, полноценного белка). Полисахариды цианобактерий представляют большой интерес, так как они проявляют
15 антиоксидантную, противовоспалительную, антимикробную и др. активности.

Известен способ культивирования микроводорослей, при котором в качестве питательной среды используют отходы рыбоводного производства в виде воды из рециркуляционной системы [Лукиянов, 2014].

Недостаток данного способа заключается в том, что при его осуществлении затраты
20 электроэнергии, помимо освещения и перемешивания суспензии, идут на подогрев питательной среды и обеспечение рециркуляции.

Известен способ культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов с периодическим чередованием световых и темновых интервалов облучения суспензии, при котором максимальное значение фотосинтеза микроорганизмов поддерживают
25 путем изменения расхода поступающей суспензии [Мельников, 2011].

Недостаток данного способа заключается в том, что при его осуществлении процесс фотосинтеза происходит периодически, а на изменение расхода питательной среды и для поддержания необходимой температуры суспензии требуются дополнительные
затраты электроэнергии.

30 Наиболее близким к заявленному является способ культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов, при котором с целью повышения производительности накопления биомассы термофильных цианобактерий рода *Phormidium*, включающем насыщение субстрата углекислотой, регулирование освещенности, температуры, химического состава субстрата. Регулирование
35 температуры и химического состава субстрата осуществляют путем подачи термальных вод природных источников Паратунской гидротермальной системы при обеспечении их проточности [патент РФ 2292389 C2, МПК C12N 1/12, опубл. 27.01.2007.].

Недостаток данного способа заключается в том, что процесс привязан к источникам гидротермальной системы, требует дополнительных затрат электроэнергии, а также
40 трудность воспроизведения установки циркуляции термальной воды.

Основными задачами заявляемого способа культивирования являются: получение биомассы термофильных цианобактерий рода *Amorphonostoc*, упрощение технологии культивирования, снижение энергетических затрат и наибольший выход полисахаридов.

Поставленные задачи решаются тем, что в способе культивирования цианобактерий
45 рода *Amorphonostoc*, включающем регулирование освещенности, температуры, химического состава субстрата, аэрации, получают наибольший выход полисахаридов.

При реализации изобретения, для накопления биомассы цианобактерий вида *Amorphonostoc* используют питательную среду следующего состава (г/л): KNO_3 - 1,00;

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ - 0,262; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,20; $NaHCO_3$ - 0,20; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,0249. Раствор микроэлементов (г/л): H_3BO_3 - 2,86; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 1,81; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,22; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,08; MoO_3 - 0,015; NH_4VO_3 - 0,023; $K_2Cr_2(SO_4)_4 \cdot 24H_2O$ - 0,096; $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,048;

5 $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,018; $Ti_2(SO_4)_3$ - 0,040; $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ - 0,044.

Культивирование *Amorphonostoc* проводят в стерильных условиях, в режиме свет/темнота 12/12 ч, белый свет с интенсивностью 5000 lx, при перемешивании 1 час со скоростью движения ротора 100 об/мин. Продолжительность культивирования составляет 21 сутки при температуре 25°C и pH=6,0.

10 Концентрация клеток биомассы цианобактерий при данных условиях составляет наибольшее значение, а выход полисахаридов является наибольшим.

Технический результат представленного способа культивирования термофильных цианобактерий рода *Amorphonostoc* заключается в упрощении технологии получения биомассы, так как в предлагаемом способе, по сравнению с прототипом, исключены

15 этапы поддержания состава большого количества термальных вод, отсутствует необходимость проточной циркуляции и значительного расхода питательной среды, в снижении трудозатрат для поддержания постоянства субстрата, химического состава и температуры; в культивировании цианобактерий при температурах 25°C, что позволяет выращивать как термофильные, так и мезофильные штаммы цианобактерий и

20 накапливать значительные количества полисахаридов. Существует возможность реализовать замкнутый цикл производства и обеспечить организацию круглогодичного производства с возможностью культивирования в любой лаборатории, биореакторе или водоеме.

Пример 1.

25 Цианобактерию *Amorphonostoc* культивируют на питательной среде следующего состава (г/л): KNO_3 - 1,00; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ - 0,262; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,20; $NaHCO_3$ - 0,20; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,0249. Раствор микроэлементов (г/л): H_3BO_3 - 2,86; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 1,81; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,22; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,08; MoO_3 - 0,015; NH_4VO_3 - 0,023; $K_2Cr_2(SO_4)_4 \cdot 24H_2O$ - 0,096;

30 $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,048; $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,018; $Ti_2(SO_4)_3$ - 0,040; $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ - 0,044.

Культивирование *Amorphonostoc* проводят в стерильных условиях, в режиме свет/темнота 12/12 ч, белый свет с интенсивностью 5000 lx, при перемешивании 1 час со скоростью движения ротора 100 об/мин. Продолжительность культивирования составляет 21 сутки при температуре 25°C и pH=6,0.

35 Концентрация клеток биомассы цианобактерий при данных условиях составляет наибольшее значение 0,58±0,08 г/л, а выход полисахаридов является наибольшим 0,32±0,36 г/г сухой массы цианобактерий.

Пример 2.

40 Цианобактерию *Amorphonostoc* культивируют на питательной среде следующего состава (г/л): KNO_3 - 1,00; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ - 0,262; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,20; $NaHCO_3$ - 0,20; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,0249. Раствор микроэлементов (г/л): H_3BO_3 - 2,86; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 1,81; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,22; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,08; MoO_3 - 0,015; NH_4VO_3 - 0,023; $K_2Cr_2(SO_4)_4 \cdot 24H_2O$ - 0,096; $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,048; $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,018; $Ti_2(SO_4)_3$ - 0,040; $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ - 0,044.

45

Культивирование *Amorphonostoc* проводят в стерильных условиях, в режиме свет/темнота 8/16 ч, белый свет с интенсивностью 4000 lx при перемешивании 0,5 часа со скоростью движения ротора 100 об/мин. Продолжительность культивирования составляет 14 суток при температуре 15°C и pH=4,0.

Концентрация клеток биомассы цианобактерий при данных условиях составляет наибольшее значение $0,31 \pm 0,05$ г/л, а выход полисахаридов является наибольшим $0,19 \pm 0,21$ г/г сухой массы цианобактерий.

Пример 3.

5 Цианобактерию *Amorphonostoc* культивируют на питательной среде следующего состава (г/л): KNO_3 - 1,00; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,262; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,20; NaHCO_3 - 0,20; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0249. Раствор микроэлементов (г/л): H_3BO_3 - 2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,22; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,08; MoO_3 - 0,015; NH_4VO_3 - 0,023; $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ - 0,096.

10 Культивирование *Amorphonostoc* проводят в стерильных условиях, в режиме свет/темнота 16/8 ч, белый свет с интенсивностью 6000 лк, при перемешивании 3 час со скоростью ротора 100 об/мин. Продолжительность культивирования составляет 27 суток при температуре 45°C и $\text{pH}=9,0$.

15 Концентрация клеток биомассы цианобактерий при данных условиях составляет наибольшее значение $0,23 \pm 0,04$ г/л, а выход полисахаридов является наибольшим $0,11 \pm 0,18$ г/г сухой массы цианобактерий.

(57) Формула изобретения

20 Способ культивирования цианобактерии *Amorphonostoc Elenkin*, в котором, для накопления биомассы используют питательную среду следующего состава (г/л): KNO_3 - 1,00; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,262; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,20; NaHCO_3 - 0,20; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0249. Раствор микроэлементов (г/л): H_3BO_3 - 2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,22; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,08; MoO_3 - 0,015; NH_4VO_3 - 0,023; $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ - 0,096; $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,048; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,018; $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$ - 0,040; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,044; культивирование *Amorphonostoc* проводят в стерильных условиях, в режиме свет/темнота 12/12 ч, белый свет с интенсивностью 5000 лк, при перемешивании 1 час со скоростью движения ротора 100 об/мин; продолжительность культивирования составляет 21 сутки при температуре 25°C и $\text{pH}=6,0$.

35

40

45