

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043745**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.19**

(51) Int. Cl. *C12N 1/12* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**202291878**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.06.01**

---

(54) **МОДИФИЦИРОВАННАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА LCN ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

---

(31) **2021/0848.2**

(56) KZ-U-3098

(32) **2021.09.03**

CN-A-108085283

(33) **KZ**

US-A-20160068799

(43) **2023.03.31**

CN-A-106591131

(96) **KZ2022/031 (KZ) 2022.06.01**

CN-A-109112068

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ТОВАРИЩЕСТВО  
С ОГРАНИЧЕННОЙ  
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ  
"РЕСПУБЛИКАНСКАЯ  
КОЛЛЕКЦИЯ  
МИКРООРГАНИЗМОВ" (KZ)**

(72) Изобретатель:

**Текебаева Жанар Борамбаевна,  
Бисенова Гульмира Нурғалиевна,  
Базарханкызы Айдана, Темирханов  
Аслан Жанаевич, Сармурзина  
Зинигуль Сериковна (KZ)**

(57) Изобретение относится к области биотехнологии и микробиологии и касается получения модифицированной питательной среды для культивирования таких пробиотических микроорганизмов как зеленые микроводоросли и молочнокислые бактерии. Предлагаемая модифицированная питательная среда LCN имеет следующий состав на 1 л воды (мас.%):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2,8%);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,4%);  $\text{CaCl}_2$  (0,1%);  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1,7%); дрожжевой экстракт (13,8%); пептон (27,7%); глюкоза (41,5%); аммоний лимоннокислый (4,1%); натрий уксуснокислый (6,9%); агар бактериологический (1%)/агар-агар-900 (1,8-2%), pH=6,5. Питательная среда готовится с соблюдением очередности внесения ингредиентов. Стерилизация при 121°C в течение 15 мин. После засева выращивание осуществляют для микроводорослей - при температуре 28-30°C и люминесцентном освещении в течение 4-7 суток, для молочнокислых бактерий - при температуре 37°C в течение 24-48 ч. Изобретение отличается от других известных стандартных сред минимальным количеством недорогих и распространенных ингредиентов, влияющих на питательную ценность среды, увеличение роста и развития микроорганизмов. Изобретение позволяет повысить выход биомассы зеленых микроводорослей и молочнокислых бактерий и упрощает процесс приготовления питательной среды. Изобретение может быть использовано при производстве биопрепаратов для очистки окружающей среды, а также кормовых добавок для рыб, животных и птиц.

**B1****043745****043745****B1**

Изобретение относится к области биотехнологии и микробиологии, а именно получению модифицированной питательной среды для культивирования таких про биотических микроорганизмов как зеленые микроводоросли и молочнокислые бактерии. Изобретение позволяет повысить выход биомассы микроорганизмов и упрощает процесс приготовления питательной среды. Изобретение может быть использовано при производстве биопрепаратов для очистки окружающей среды, а также кормовых добавок для рыб, животных и птиц.

Значимость пробиотических препаратов и кормовых добавок диктует необходимость разработки новых эффективных и недорогих питательных сред для наработки микробной биомассы. При производстве биопрепаратов и биологически активных добавок важным является разработка питательной основы, которая должна включать все основные компоненты, соответствующие потребностям микроорганизмов. Производственная питательная среда должна обеспечивать высокую скорость размножения и высокую концентрацию жизнеспособных микробных клеток. Питательные потребности молочнокислых бактерий (МКБ) весьма разнообразны и связаны с биохимической активностью микроорганизмов, а именно способностью сбраживать углеводы, усваивать белки (в форме гидролизатов и автолизатов). Основные элементы питания для микроводорослей являются азот, фосфор, сера, микроэлементы. Также для максимального прироста для микроводорослей необходимы освещение, температура, аэрация и углекислый газ.

Известна питательная среда Люка для культивирования микроводорослей (патент RU 2556126 кл. C1, C12N 1/12, 2015), которая содержит минеральный ионит "Ionsorb™" (0,2%), стабилизированный гашеной известью куриный помет (0,05%) и водопроводную воду (99,75%).

Недостатком данной среды является необходимость использования ионита, который достаточно сложно приобрести. Куриный помет относится к отходам 3-го класса опасности, его гашение требует специальных навыков и тщательного соблюдения техники безопасности.

Известна питательная среда для выращивания молочнокислых бактерий (KZ 29843 кл. C12N 1/20, C12N 1/38, 2015), обогащенная смесью различных аминокислот (мас. %: L-глутаминовой кислоты 0,02%, L-цистеина 0,02%, L-лизина 0,02%, L-гистидина 0,02%, L-аланина 0,02%, L-метионина 0,02%).

Недостатком данной среды является многокомпонентность состава, а также использование смеси аминокислот, которые являются дорогостоящими.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому результату к заявляемому прототипу является обогащенная питательная среда для выращивания молочнокислых бактерий (KZ 30240 кл. C12N 1/20, C12N 1/38, 2015) следующего состава в граммах на 1 л воды (мас. %): гидролизат казеина - 10 (15,5%); мясной экстракт - 10 (15,5%); дрожжевой экстракт - 5 (7,8%); глюкоза - 20 (31,1%); ацетат натрия - 5 (7,8%); цитрат аммония (двузамещенный) - 2 (3,1%); твин-80 - 1 (1,6%);  $K_2HPO_4$  - 2 (3,1%);  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,2 (0,3%);  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0,05 (0,08%); СОБ (сухое обезжиренное коровье молоко) 9,0-11,0 (14,05-17%); L-глутаминовой кислоты - 0,01 (0,02%); L-цистеина - 0,01 (0,02%); L-лизина - 0,01 (0,02%); тиамин - 0,0001 (0,0002%); никотиновой кислоты - 0,0001 (0,0002%); пантотената кальция - 0,0001 (0,0002%); рибофлавин - 0,0001 (0,0002%).

Недостатком данной среды является многокомпонентность состава, а также использование смеси аминокислот и витаминов, которые не всегда доступны и к тому же являются дорогостоящими.

Также наиболее близким по технической сущности и достигаемому результату к заявляемому прототипу является питательная среда для выращивания микроводоросли хлореллы (патент SU 506962, 1976) на основе среды Тамия с добавлением аммофоса, калимагнезия и хлорного железа.

Недостатком данной среды является относительно низкий темп прироста биомассы.

Задачей изобретения является разработка питательной среды для культивирования и получения биомассы как молочнокислых бактерий, так и зеленых микроводорослей за небольшой промежуток времени.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, выражается в приготовлении питательной среды для культивирования и получения биомассы зеленых микроводорослей и молочнокислых бактерий.

Штаммы зеленых микроводорослей и молочнокислых бактерий культивируют на модифицированной питательной среде LCH следующего состава в граммах на 1 л воды (мас. %):  $KH_2PO_4$  - 1 (2,8%);  $K_2HPO_4$  - 0,5 (1,4%);  $CaCl_2$  - 0,04 (0,1%);  $NH_4NO_3$  - 0,6 (1,7%); дрожжевой экстракт - 5 (13,8%); пептон - 10 (27,7%); глюкоза - 15 (41,5%); аммоний лимоннокислый - 1,5 (4,1%); натрий уксуснокислый - 2,5 (6,9%). Для агаризованной среды добавляется агар бактериологический - 10 (1,0%) / агар-агар 900 - 18-20 (1,8-2,0%), pH=6,5. Стерилизация при 121°C в течение 15 мин. Питательная среда готовится с соблюдением очередности внесения ингредиентов. После засева выращивание осуществляют: для микроводорослей - при температуре 28-30°C в течение 4-7 суток, для молочнокислых бактерий - при температуре 37°C в течение 24-48 ч.

Сущность получения модифицированной питательной среды для культивирования микроводорослей и молочнокислых бактерий заключается в следующем: для приготовления среды LCH были подобраны ингредиенты, наличие которых влияет на питательную ценность среды, выход биомассы микроорганизмов, а также не дорогие и широко распространенные компоненты.

В основном рост и размножение микроорганизмов происходит благодаря присутствию определенных компонентов, если исключить, или добавить определенное вещество, то рост биомассы может пойти

в благоприятную сторону, так и не в благоприятную.

Для получения модифицированной нами питательной среды LCH, предназначенной для культивирования микроводорослей и молочнокислых бактерий были включены ингредиенты из состава следующих дифференцированных сред (табл. 1): MRS (для молочнокислых бактерий), 04 (для зеленых микроводорослей) и Тамия (для зеленых микроводорослей).

Таблица 1

Варианты питательных сред			
Состав сред, г/л			
MRS	04	Тамия	LCH
дрожжевой экстракт-0,5; пептон-10; глюкоза-20; (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> -2; CH <sub>3</sub> COONa- 5; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2; MnSO <sub>4</sub> - 0,05; MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O - 0,2; твин 80 – 1 мл/л; лактоза-1; агар бактериологический – 10. pH=6,8.	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 0,1; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,1; CaCl <sub>2</sub> – 0,04; NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> - 0,3; агар-агар -13.	KNO <sub>3</sub> – 5; MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O — 2,5; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1,25; Fe(SO <sub>4</sub> )*7H <sub>2</sub> O -0,009; ЭДТА — 0,037; раствор микроэлементов — 1 мл/л; агар-агар 900 — 20. Раствор микроэлементов (г/л): 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 – 0,222; MoO <sub>3</sub> – 176,4 мг/л; NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub> – 229,6 мг/л. pH=6,5-7,0.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,5; CaCl <sub>2</sub> – 0,04; NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> - 0,6; дрожжевой экстракт – 5; пептон – 10; глюкоза – 15; (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> – 1,5; CH <sub>3</sub> COONa – 2,5; агар бактериологический – 10 (агар-агар 900 – 18-20). pH=6,2-6,5.
Стерилизация при 1,1 атм. (121°C) в течение 20 минут.	Стерилизация при 1,1 атм. (121°C) в течение 15 минут.	Стерилизация при 1,1 атм. (121°C) в течение 15 минут.	Стерилизация при 1,1 атм. (121°C) в течение 15 минут.

Пример 1. Исследована жизнеспособность МКБ и микроводорослей на различных дифференцированных плотных средах MRS, 04, Тамия и MRS (табл. 2). МКБ не растут на средах, предназначенных для культивирования микроводорослей, поэтому их жизнеспособность (ЖСП) изучена на средах MRS и LCH в чашках Петри. Оценка показателя ЖСП культур МКБ проводили методом Miles&Misra [1]. Для этого методом предельных разведений (10<sup>4</sup>-10<sup>9</sup>) делали посеvy на плотные среды в чашки Петри и после инкубации проводили подсчет выросших колоний.

Плотность клеток микроводорослей изучали на жидких средах 04, Тамия и LCH через 5 суток культивирования методом подсчета клеток с помощью камеры Горяева [2]. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Показатели жизнеспособности МКБ и числа клеток микроводорослей				
Штаммы	Среда MRS	Среда 04	Среда Тамия	Модифицированная среда LCH
<i>Lactobacillus brevis</i> 4 LB	1,5×10 <sup>8</sup> КОЕ/мл	н/и	н/и	4,5×10 <sup>7</sup> КОЕ/мл
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BSR	2,0×10 <sup>8</sup> КОЕ/мл	н/и	н/и	1,0×10 <sup>8</sup> КОЕ/мл
<i>Chlorella vulgaris</i> И2	н/и	3,9×10 <sup>6</sup> млн.кл/мл	4,5×10 <sup>6</sup> млн.кл/мл	7,6×10 <sup>6</sup> млн.кл/мл
<i>Chlorella vulgaris</i> ZH-1	н/и	4,5×10 <sup>6</sup> млн.кл/мл	4,7×10 <sup>6</sup> млн.кл/мл	9,5×10 <sup>6</sup> млн.кл/мл
Примечание: н/и – не исследовалось				

Результаты оценки жизнеспособности МКБ показывают практически одинаковые показатели роста бактерий на средах MRS и LCH, что составляет 1,5×10<sup>8</sup> КОЕ/мл и 2,0×10<sup>8</sup> КОЕ/мл соответственно.

Число клеток зеленых микроводорослей на модифицированной питательной среде LCH в 1,9-2,1 раз выше, чем на стандартной среде 04 и в 1,7-2,0 раз выше, чем на стандартной среде Тамия.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что состав компонентов среды, условия культивирования подобраны соответственно потребностям для роста исследуемых микроорганизмов.

Пример 2. Изучена оценка роста и накопления биомассы на жидких питательных средах объемом 10 л с помощью лабораторного биореактора Algaemaster 10 (ИКА, Германия). Накопление биомассы проверяли по величине оптической плотности с помощью спектрофотометра Agilent Cary 600 при 600 нм для МКБ и 440/600 нм для микроводорослей (табл. 3).

## Накопление биомассы МКБ и микроводорослей

<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BSR			
Параметры культивирования	Продолжительность культивирования	Оптическая плотность на среде MRS, 600 нм	Оптическая плотность на среде LCH, 600 нм
60 об/мин; 37°C; pH=6,5-6,8	5 ч	0,4948	0,3985
	7 ч	0,7984	0,7214
	10 ч	1,1034	1,0269
	14 ч	1,3598	1,4258
	18 ч	2,2315	2,1669
<i>Chlorella vulgaris</i> ZH-1			
Параметры культивирования	Продолжительность культивирования	Оптическая плотность на среде Тамия, 440 нм	Оптическая плотность на среде LCH, 600 нм
60 об/мин; 30°C; pH=6,2-6,5; освещенность, CO <sub>2</sub> .	1 сут	0,856	0,773
	2 сут	1,182	1,335
	3 сут	1,920	3,367
	4 сут	3,425	4,218
	5 сут	4,980	10,000

При культивировании микроводоросли *Chlorella vulgaris* ZH-1 в биореакторе на среде LCH наблюдается увеличение прироста биомассы по сравнению со средой Тамия в 2 раза. У штамма *Lactobacillus rhamnosus* BSR показатели прироста биомассы на средах MRS и LCH практически одинаковые.

Культивирование на модифицированной питательной среде LCH зеленых микроводорослей и штаммов молочнокислых бактерий в сравнении с дифференцированными средами для каждого вида микроорганизма делает возможным и целесообразным использовать ее для получения продуктивной и стабильной биомассы как в малых, так и в больших объемах. Следует отметить стабильный рост исследуемых видов микроорганизмов как в жидкой, так и на агаризованной среде LCH.

Литература.

1 Miles A.A., Misra S.S., Irwin J.O. The estimation of the bactericidal power of the blood. -The Journal of hygiene. - Nov., 1938. - P. 732-749.

2 Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф., Кузьменко М.И., Козицкая В.Н., Величко И.М., Мыслович В.О., Гавриленко М.Я., Арндарчук В.В., Кириенко Ю.А. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. - Киев: Наукова думка, 1975. - 247 с.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Модифицированная питательная среда для культивирования зеленых микроводорослей и молочнокислых бактерий, содержащая гидроортофосфат (2,8%), дрожжевой экстракт (13,8%), глюкозу (41,5%), натрий уксуснокислый (6,9%), цитрат аммония (4,1%), отличающаяся тем, что в качестве ингредиентов, повышающих выход биомассы, дополнительно используются доступные макро- и микроэлементы в виде монофосфата калия (1,4%), хлорида кальция (0,1%) и нитрата аммония (1,7%), пептона (27,7%).



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2