

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291878** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.03.31

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

(22) Дата подачи заявки
2022.06.01

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

(31) **2021/0848.2**

(32) **2021.09.03**

(33) **KZ**

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

(71) Заявитель:

**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ
"РЕСПУБЛИКАНСКАЯ
КОЛЛЕКЦИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ"
МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
КАЗАХСТАН (KZ)**

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

Текебаева Ж.Б. (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 LCH имеет следующий состав на 1 л воды (мас.%): K_2HPO_4 (2,8%); K_2HPO_4 (1,4%); CaCl_2 (0,1%); NH_4NO_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.

A1

202291878

202291878

A1

МОДИФИЦИРОВАННАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА LCN ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Изобретение относится к области биотехнологии и микробиологии, а именно получению модифицированной питательной среды для культивирования таких пробиотических 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 2 556 126 кл. C1, C12N1/12, 2015), которая содержит минеральный ионит «IonsorbTM» (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. C12N1/20, C12N1/38, 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. C12N1/20, C12N1/38, 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%); $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0,2 (0,3%); $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$ – 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%); рибофлавина – 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 хлорелла (патент SU 506962, 1976) на основе среды Тамия с добавлением аммофоса, калимагнесия 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 часов.

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 (таблица 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 ₄) ₃ C ₆ H ₅ O ₇ -2; CH ₃ COONa- 5; K ₂ HPO ₄ – 2; MnSO ₄ - 0,05; MgSO ₄ *7H ₂ O - 0,2; твин 80 – 1 мл/л; лактоза-1; агар бактериологический – 10. pH=6,8.	K ₂ HPO ₄ - 0,1; KH ₂ PO ₄ – 0,1; CaCl ₂ – 0,04; NH ₄ NO ₃ - 0,3; агар-агар -13.	KNO ₃ – 5; MgSO ₄ *7 H ₂ O — 2,5; KH ₂ PO ₄ – 1,25; Fe(SO ₄)*7H ₂ O -0,009; ЭДТА — 0,037; раствор микроэлементов — 1 мл/л; агар-агар 900 — 20. Раствор микроэлементов (г/л): H ₃ BO ₃ – 2,86; MnCl ₂ *4H ₂ O – 1,81; ZnSO ₄ * 7H ₂ O – 0,222; MoO ₃ – 176,4 мг/л; NH ₄ VO ₃ – 229,6 мг/л. pH=6,5-7,0.	KH ₂ PO ₄ – 1; K ₂ HPO ₄ – 0,5; CaCl ₂ – 0,04; NH ₄ NO ₃ - 0,6; дрожжевой экстракт – 5; пептон – 10; глюкоза – 15; (NH ₄) ₃ C ₆ H ₅ O ₇ – 1,5; CH ₃ 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 (таблица 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 (10^4 - 10^9) 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 таблице 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	$1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл	н/и	н/и	$4,5 \times 10^7$ КОЕ/мл
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BSR	$2,0 \times 10^8$ КОЕ/мл	н/и	н/и	$1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл
<i>Chlorella vulgaris</i> И2	н/и	$3,9 \times 10^6$ млн.кл/мл	$4,5 \times 10^6$ млн.кл/мл	$7,6 \times 10^6$ млн.кл/мл
<i>Chlorella vulgaris</i> ZH-1	н/и	$4,5 \times 10^6$ млн.кл/мл	$4,7 \times 10^6$ млн.кл/мл	$9,5 \times 10^6$ млн.кл/мл
<i>Примечание:</i> н/и – не исследовалось				

Результаты оценки жизнеспособности МКБ показывают практически одинаковые показатели роста бактерий на средах MRS и LCH, что составляет $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл и $2,0 \times 10^8$ 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 (таблица 3).

Таблица 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; рН=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; рН=6,2-6,5; освещенность, CO ₂ .	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., Арендарчук В.В., Кирпенко 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%), глюкоза (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%).

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202291878

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12N 1/12 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C12N 1/12, C12N 1/20, C12N 1/38

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, Patentscope, Espacenet, eLibrary.ru, Google.

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	KZ 3098 U (ДОНЕНОВ Б.К., КАЙНАРБАЕВА Ж.Н.) 2017-09-22 описание, формула	1
A	CN 108085283 A (HE HONGDI) 2018-05-29 реферат (перевод Patentscope)	1
A	US 20160068799 A (CITY UNIVERSITY OF HONG KONG) 2016-03-10 реферат, описание, формула	1
A	CN 106591131 A (QINGDAO LITIAN HONGTAI NEW ENERGY TECHNOLOGY CO., LTD.) 2017-04-26 реферат (перевод Patentscope)	1
A	CN 109112068 A (WUXI SANZHI BIO-TECH CO., LTD.) 2019-01-01 реферат (перевод Patentscope)	1

последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **22/02/2023**

Уполномоченное лицо:
Заместитель начальника Управления экспертизы
Начальник отдела химии и медицины



А.В. Чебан