



(51) МПК
C12N 1/12 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/12 (2006.01); *C12P 23/00* (2006.01); *C12R 1/89* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017114369, 25.04.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 25.04.2017

Дата регистрации:
 08.02.2018

Приоритет(ы):
 (22) Дата подачи заявки: 25.04.2017

(45) Опубликовано: 08.02.2018 Бюл. № 4

Адрес для переписки:
 143026, Москва, ул. территория инновационного
 центра "Сколково", 4, ООО "ЦИС "Сколково"

(72) Автор(ы):
 Кузьмин Денис Владимирович (RU),
 Гусев Евгений Сергеевич (RU),
 Петрушкина Мария Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
 Общество с ограниченной ответственностью
 "СОЛИКСАНТ" (ООО "СОЛИКСАНТ")
 (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: KIM S.M., JUNG Yu- Jin, CHA K.H.
 et al. A potential commercial source of
 fucoxanthin extracted from the Microalga
 Phaeodactylum tricornutum, Applied
 biochemistry and biotechnology, 2012, v. 166,
 N 7, p. 1843-1855. RU 2054442 C1, 28.07.1993.
 РЯБУШКО В.И., ЖЕЛЕЗНОВА С.Н., и
 др. Влияние азота на накопление
 фукоксантина диатомовой водорослью
 (см. прод.)

(54) ШТАММ ОДНОКЛЕТОЧНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ MALLOMONAS KALINAE - ПРОДУЦЕНТ
 КАРОТИНОИДА ФУКОКСАНТИНА

(57) Реферат:
 Изобретение относится к биотехнологии.
 Штамм одноклеточных микроводорослей
 Mallomonas kalinae SX-1 – продуцент фукоксантина
 - депонирован в Национальном биоресурсном
 центре Всероссийской коллекции промышленных

микроорганизмов под регистрационным номером
 ВКПМ А1-23. Штамм может быть использован
 для получения фукоксантина с высоким выходом.
 2 пр.

(56) (продолжение):

Cylinrotheca closterium (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN. Альгология. Физиология, биохимия,
 биофизика, 2017, N 1, 27(1), с. 15-21. RU 2399298 C1, 20.09.2010.

RU 2 644 260 C1

RU 2 644 260 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/12 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 1/12 (2006.01); C12P 23/00 (2006.01); C12R 1/89 (2006.01)(21)(22) Application: **2017114369, 25.04.2017**(24) Effective date for property rights:
25.04.2017Registration date:
08.02.2018

Priority:

(22) Date of filing: **25.04.2017**(45) Date of publication: **08.02.2018** Bull. № 4

Mail address:

**143026, Moskva, ul. territoriya innovatsionnogo
tsentra "Skolkovo", 4, OOO "TSIS "Skolkovo"**

(72) Inventor(s):

**Kuzmin Denis Vladimirovich (RU),
Gusev Evgenij Sergeevich (RU),
Petrushkina Mariya Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"SOLIKSANT" (OOO "SOLIKSANT") (RU)**(54) **SINGLE-CELL MICROALGAE STRAIN MALLOMONAS KALINAE - THE PRODUCTION OF
CAROTHYNOID FUKOXANTINE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology.
Strain of unicellular microalgae Mallomonas kalinae
SX-1 – producer of fucoxanthin – is deposited in
Russian National Collection of IndustrialMicroorganisms under registration number VKPM Al-
23.EFFECT: strain can be used in order to produce
fucoxanthin in high yield.

1 cl, 2 ex

C 1
0 9 0
2 6 4 4 2 6 0
R UR U
2 6 4 4 2 6 0
C 1

Область техники

Изобретение относится к области микробиологии и биотехнологии и может быть использовано для получения биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью.

5 Уровень техники

Антиоксиданты – это вещества, ингибирующие процессы окисления органических соединений и защищающие организм от негативного воздействия свободных радикалов и других веществ, влияя на процессы старения, канцерогенеза, токсического повреждения органов и тканей и др. Одним из источников антиоксидантных соединений являются водоросли, способные к синтезу широкого спектра антиоксидантов, таких как атаксантин, фукоксантин, бета-каротин и т.д.

Фукоксантин является одним из наиболее распространенных каротиноидов в природе. Это доминирующий каротиноид у гетероконтных и гаптофитовых водорослей, которые включают в себя более 20 тысяч видов. Среди представителей этих групп водорослей есть планктонные водоросли, доминирующие в мировом океане, такие как диатомовые микроводоросли, кокколитофориды, представители группы *Phaeocystis*, и бурые макроводоросли, доминирующие в прибрежной части морей и океанов.

В водорослях фукоксантин выполняет функцию светопоглощающего пигмента и переноса энергии на хлорофилл-белковый комплекс в процессе фотосинтеза. Также фукоксантин обладает высокой антиоксидантной активностью и может выполнять фотопротекторную функцию, защищая клетку от избыточного освещения. Недавно было показано, что фукоксантин оказывает положительное влияние на организмы и обладает противораковой, гипотензивной, противовоспалительной активностями и способствует снижению веса при ожирении (Shiratori et al., 2005; Martin, 2015; Muradian et al., 2015).

Коммерческое производство фукоксантина встречает несколько проблем. Фукоксантин может быть синтезирован химически, однако эффективность выхода такой реакции достаточно низкая (Yamano et al., 1995). В настоящее время промышленное производство фукоксантина происходит из бурых водорослей, таких как *Laminaria japonica*, *Eisenia bicyclis*, *Undaria pinnatifida* и *Hijikia fusiformis*. Однако концентрация фукоксантина в бурых водорослях невысока (Kanazawa et al., 2008).

Микроводоросли являются перспективным источником фукоксантина для коммерческого производства. Они обладают более высокой концентрацией фукоксантина в биомассе по сравнению с макроводорослями. Также в связи с развитием методов промышленного культивирования микроводорослей в фотобиореакторах эффективность выращивания микроводорослей растет. Тем не менее, несмотря на большое количество видов микроводорослей, синтезирующих фукоксантин, только несколько видов используются для коммерческого производства фукоксантина (Kim et al., 2012; Xia et al., 2013). Эти виды относятся к двум группам фукоксантин-содержащих микроводорослей: диатомовых и примнезиофитовых.

Известен штамм пеннатной диатомовой микроводоросли *Phaeodactylum tricoratum*, депонированный в КММСС (В-007), содержащий до 15,71 мг фукоксантина на грамм сухого веса (Kim et al., 2012).

Известен штамм примнезиофитовой микроводоросли *Isochrysis aff. galbana* (*Tisochrysis lutea*), депонированный в ССМР (1324), выделенный из морской воды, отобранной на острове Таити, и содержащий до 18,23 мг фукоксантина на грамм сухого веса (Kim et al., 2012).

Также известен штамм центрической диатомовой микроводоросли *Odontella aurita*,

депонированный в SCCAP (K-1251), выделенный из морской воды, отобранной на Канарских островах, и содержащий до 21,67 мг фукоксантина на грамм сухого веса (Xia et al., 2013).

Недостатком этих штаммов является необходимость поддержания высокой концентрации солей в составе среды культивирования, что приводит к дополнительным затратам при производстве, а также недостаточно высокое содержание фукоксантина.

Раскрытие изобретения

Задачей настоящего изобретения является получение нового штамма-продуцента фукоксантина, обладающего высоким содержанием фукоксантина, а также способного расти в средах с низкой концентрацией солей.

Задача решается путем получения нового штамма одноклеточных микроводорослей *Mallomonas kalinae* SX-1 - продуцента каротиноида фукоксантина.

Штамм *Mallomonas kalinae* SX-1 депонирован в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ «ГосНИИгенетика» Министерства образования и науки РФ под регистрационным номером ВКПМ А1-23.

Предлагаемый штамм одноклеточной микроводоросли *Mallomonas kalinae* SX-1 ВКПМ А1-23 в качестве продуцента фукоксантина имеет ряд преимуществ, которые обеспечивают технический результат настоящего изобретения, заключающийся в следующем:

- наибольшая известная концентрация фукоксантина 28 мг фукоксантина на грамм сухого веса;

- способность расти в средах с низкой концентрацией солей, в том числе при концентрации 0 граммов NaCl на литр среды.

Подробное описание изобретения

Штамм *Mallomonas kalinae* SX-1 ВКПМ А1-23 был получен микробиологическим методом путем выделения на селективных средах и использованием микроманипуляции для получения отдельных клеток. Выделение проводили следующим способом. Образцы природной воды отбирали в Приморском крае (Россия) в пресноводном водоеме. Для этого использовали планктонную сеть с ячейкой 20 мкм. Из нефиксированных проб пипеткой выделяли отдельные клетки, промывали в каплях стерилизованной воды и помещали в лунку (300 мкл) планшета для иммуноферментного анализа. После трех недель роста альгологически чистые культуры переносили в чашки Петри диаметром 40 мм, содержащие жидкую минеральную среду WC следующего состава: CaCl₂·2H₂O – 36,8 мг, MgSO₄·7H₂O - 37 мг, NaHCO₃ – 12,60 мг, K₂HPO₄·3H₂O – 11,4 мг, NaNO₃ – 85 мг, Na₂SiO₃·9H₂O – 21,2 мг, раствор микроэлементов – 1 мл, витамины – 1 мл (Guillard & Lorenzen, 1972), водопроводная вода - 1 л. Инкубирование проводили при температуре 22 - 28 °C в течение 1 месяца при непрерывном или переменном освещении (120 мкмоль/м²×с) с циклом день/ночь 16/8 часов.

Идентификация штамма была осуществлена на основании изучения его культурально-морфологических признаков в соответствии с критериями, приведенными в монографии Kristiansen&Preisig, 2007.

Хранение штамма одноклеточных водорослей *Mallomonas kalinae* SX-1 ВКПМ А1-23 осуществляется на жидкой минеральной среде WC. Инкубирование проводили при температуре 22 – 28 °C в течение 1 месяца при непрерывном или переменном освещении (120 мкмоль/м²×с) с циклом день/ночь 16/8 часов. Более длительное хранение осуществляется путем периодического (оптимально – один раз в месяц, максимально – один раз в несколько месяцев) пересева на свежую жидкую минеральную среду WC.

Штамм *Mallomonas kalinae* SX-1 ВКПМ А1-23 характеризуется следующими культурально-морфологическими, физиологическими признаками и биологическими свойствами.

5 Культуральные свойства. На жидкой среде WC характеризуется ростом в виде бурой взвеси. Степень чистоты культуры – альгологически чистая. Отсутствие водорослей других видов контролировали при световой фазово-контрастной микроскопии.

10 Морфологические признаки. Клетки имеют удлинённо-эллипсоидную форму, размером 18-25 × 8-15 мкм. Клетки покрыты чешуйками. Хлоропласт одиночный, двухлопастной. Клетки с двумя жгутиками, коротким и длинными (виден только длинный). Кремнеземные чешуйки овальные 3,6–4,3 × 2,2–2,5 мкм. При хранении свыше 2-х месяцев без пересева клетки обездвиживаются и образуют скопления в слизи.

Молекулярная идентификация. Штамм *Mallomonas kalinae* SX-1 ВКПМ А1-23 обладает 97% сходства с *Mallomonas kalinae* CCMP3213 (KM817872.1). Нуклеотидная последовательность участка 18S рРНК: TTTTGGGAAGGGGGTGTATTATTAGATG
 15 GAAAACCAATGCGGGGGCAACCCCGGTATCTGGTGAATTCATAATAACTTTCGGAT
 CGACTTTTGTGCGATGCATCATTTCAAGTTTTTGCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGT
 ATTGGCCTACCATGGCTTTAACGGGTAACGGAGAATTTAGGGTTCGATCCGGAGA
 GGGAGCCTGAGAAATGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTAC
 CCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATATCGATGCCGGGCTTTTTTAAG
 20 TTTGGCAATTGGAATGAGAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGC
 AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATACTAAAGTTG
 TTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGATCGTGGCAACCGGTCCGCCTCTTC
 ATGGGGTGTGTACCAGGTCTCTGCGGTATCCTCGGGGTGCTCGTATCTGGCATTA
 GTTGTCGGGTACGCTATCCTCGTCAATTTACTGTGAGCAAAATAGAGTGTTCAAAGCA
 25 GGCTTAGGCCTTTGAATATCTTAGCATGGAATAATAAGATAGGACCTTGGTCTATTT
 TGTTGGTTTGTATTCCAAGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTCGTATTC
 AATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGGAAGACGAACTACTGCGAAAGCATT
 TACCAAATATGTTTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAG
 ATACCATCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATTTGGTGGTTGCTCGTA
 30 ATGACTCCATCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCGGGGGGGAGTAT
 GGTGCAAGGCTGAAACTTAAAAGAAATTGACGGAAGGGCACACCAGGAGTGGA
 GCCTGCGGCTTTAATTTGAACTCAACACGGGGAACTTACCAGGTCCAAGACATAG
 TGAGGATGACAGATTGAAGAGCTCTTTCTTTGATTCTATGGGGTGGTGGTGCAATG
 GCCGTTTCTTTAGTTTGGTGGGAGTGATTTGTCTGGGTAAATTTCCGTTAACC

35 Физиологические свойства. Оптимальными условиями для максимальной продукции фукоксантина штаммом *Mallomonas kalinae* SX-1 ВКПМ А1-23 является жидкая минеральная среда WCx10 следующего состава: CaCl₂·2H₂O – 36,8 мг, MgSO₄·7H₂O - 37 мг, NaHCO₃ – 12,60 мг, K₂HPO₄·3H₂O – 114 мг, NaNO₃ – 850 мг, Na₂SiO₃·9H₂O – 21,2 мг, раствор микроэлементов – 1 мл, витамины – 1 мл, водопроводная вода - 1 л.
 40 Минерализация среды в диапазоне 0 - 0,1 г/л, наличие перемешивания, температура 22 – 28 °С, освещение люминесцентными лампами 120 мкмоль/м²×с (16 ч с перерывом 8 ч.).

В качестве источника CO₂ использует воздух с концентрацией углекислого газа 5%
 45 при периодическом перемешивании на перемешивающем устройстве Multitron с частотой колебаний платформы 150 об/мин. Штамм не обладает инфекционным и общетоксическим действием. Штамм является непатогенным и не включен в списки, приведенные в санитарных правилах СП 1.3.2322-08; штамм не несет опасных

генетических конструкций.

Штамм *Mallomonas kalinae* SX-1 депонирован в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ «ГосНИИгенетика» Министерства образования и науки РФ под регистрационным номером ВКПМ А1-23.

5 Возможность применения на практике штамма одноклеточных водорослей *Mallomonas kalinae* SX-1 ВКПМ А1-23 обуславливается его способностью продуцировать биологически активные вещества, обладающие антиоксидантной активностью. Полученный штамм перспективен для создания на его основе биологически активной добавки (БАД), применяемой для непосредственного употребления в пищу, в качестве
10 профилактического средства или для создания функциональных пищевых продуктов. Также штамм может использоваться в аквакультуре для кормления личинок креветки и других беспозвоночных, рыбы, получения биотоплива, липидов, белка, омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, эйкозапентаеновой кислоты, наноструктурированных частиц кремния, пигментов, каротиноидов, в том числе
15 антиоксидантов, фукоксантина, препаратов для похудения, биологически активных добавок для питания человека и т.д.

Перечисленные примеры применения изобретения на практике не являются ограничивающими и могут быть расширены.

Возможность объективного проявления технического результата при использовании
20 изобретения подтверждена достоверными данными, приведенными в примерах, содержащих сведения экспериментального характера, полученными в процессе проведения исследований по методикам, принятым в данной области.

Нижеследующие примеры приведены в целях иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие
25 объем изобретения.

Пример 1. Производство биомассы, обогащенной фукоксантином с использованием штамма *Mallomonas kalinae* SX-1 ВКПМ А1-23 при фиксированном уровне освещения.

При выращивании штамма в емкостях, содержащих среду WCx10, при освещенности
30 120 мкмоль/м²×с и температуре 22 – 28 °С максимальное содержание фукоксантина достигается на 14-й день культивирования и составляет 10 мг фукоксантина на грамм сухой биомассы. При этом максимальное содержание сухой биомассы составляет 3 г/л, что соответствует 30 мг фукоксантина на литр среды. После окончания выращивания среда, содержащая биомассу, центрифугируется, собранная биомасса лиофилизируется. Биомасса может использоваться в полученном виде как компонент кормов,
35 функционального питания и в других областях применения, не требующих использования очищенного фукоксантина. При необходимости фукоксантин может экстрагироваться из биомассы с использованием органических растворителей, таких как ацетонитрил, этанол или метанол. Для этого используют, например, хроматограф «Shimadzu» Nexera X2 (Япония), оснащенный фотодиодным детектором SPD M20A и капиллярной колонкой
40 Discovery C18 (длина 15 см, внутренний диаметр 4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм) («Supelco», США). Сбор и обработку данных проводят с помощью пакета программ «LabSolutions» с использованием персонального компьютера. Измерения проводят в трех повторностях.

Пример 2. Производство биомассы, обогащенной фукоксантином, с использованием штамма *Mallomonas kalinae* SX-1 ВКПМ А1-23 при переменном уровне освещения.

45 При выращивании штамма в емкостях, содержащих среду WCx10, при освещенности 240 мкмоль/м²×с и температуре 22 – 28 °С максимальное содержание биомассы достигается на 9-12 день культивирования и составляет 4 г сухой биомассы на литр среды. При этом содержание фукоксантина составляет 5 мг на грамм сухой биомассы,

что соответствует 20 мг фукоксантина на литр среды. После достижения максимального содержания биомассы в среде на 9-12 день культивирования уровень освещенности культуры снижается с 240 мкмоль/м²×с до 20 мкмоль/м²×с, при этом все остальные параметры культивирования остаются неизменными. При низкой освещенности концентрация фукоксантина в течение 3-6 дней увеличивается с 5 мг на грамм сухой биомассы до 28 мг на грамм сухой биомассы, что соответствует 112 мг фукоксантина на литр среды. После окончания выращивания среда, содержащая биомассу, центрифугируется, собранная биомасса лиофилизируется.

При необходимости фукоксантин может экстрагироваться из биомассы с использованием органических растворителей, таких как ацетонитрил, этанол или метанол. Для этого может быть использован хроматограф «Shimadzu» Nexera X2 (Япония), оснащенный фотодиодным детектором SPD M20A и капиллярной колонкой Discovery C18 (длина 15 см, внутренний диаметр 4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм) («Supelco», США). Сбор и обработку данных проводят с помощью пакета программ «LabSolutions» с использованием персонального компьютера.

Несмотря на то что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные подробно описанные эксперименты приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

Источники информации

1. Shiratori K., Ohgami K., Ilieva I., Jin X.H., Koyama Y., Miyashita K., Yoshida K., S. Kase, S. Ohno, Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo // *Experimental eye research*. – 2005. – Т. 81. – №. 4. – С. 422-428.

2. Martin L.J. Fucoxanthin and its metabolite fucoxanthinol in cancer prevention and treatment // *Marine drugs*. – 2015. – Т. 13. – №. 8. – С. 4784-4798.

3. Muradian K., Vaiserman A., Min K.J., Fraifeld V.E. Fucoxanthin and lipid metabolism: A minireview // *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. – 2015. – Т. 25. – №. 10. – С. 891-897.

4. Yamano Y., Tode C., Ito M. Carotenoids and related polyenes. Part 3. First total synthesis of fucoxanthin and halocynthiaxanthin using oxo-metallic catalyst // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. – 1995. – №. 15. – С. 1895-1904.

5. Kanazawa K., Ozaki Y., Hashimoto T., Das S.K., Matsushita S., Hirano M., Okada T., Komoto A., Mori N., Nakatsuka M. Commercial-scale preparation of biofunctional fucoxanthin from waste parts of brown sea algae *Laminaria japonica* // *Food science and technology research*. – 2008. – Т. 14. – №. 6. – С. 573-573.

6. Kim S.M., Kang S.W., Kwon O.N., Chung D., Pan C.H. Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: Characterization of extraction for commercial application // *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. – 2012. – Т. 55. – №. 4. – С. 477-483.

7. Xia S., Wang K., Wan L., Li A., Hu Q., Zhang C. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita* // *Marine drugs*. – 2013. – Т. 11. – №. 7. – С. 2667-2681.

8. Kim S.M., Jung Y.J., Kwon O.N., Cha K.H., Um B.H., Chung D., Pan C.H. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornerutum* // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2012. – Т. 166. – №. 7. – С. 1843-1855.

9. Guillard R.R.L., Lorenzen C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide C // *Journal of*

Phycology. – 1972. – Т. 8. – №. 1. – С. 10-14.

10. Kristiansen J., Preisig, H.R. Chrysophyta and Haptophyta Algae, 2nd part. Synurophyceae. In: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L., Preisig, H.R. & Schagerl, M. (eds) Süßwasserflora von Mitteleuropa (Freshwater flora of Central Europe) 1/2. Springer-Verlag, Berlin, 2007, 252 pp.

5

(57) Формула изобретения

Штамм одноклеточной микроводоросли *Mallomonas kalinae* SX-1 ВКПМ А1-23 - продуцент каротиноида фукоксантина.

10

15

20

25

30

35

40

45