



(51) МПК  
*C12N 1/12* (2006.01)  
*C12P 7/64* (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 7/64* (2006.01); *C12R 1/89* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017143643, 13.12.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 13.12.2017

Дата регистрации:  
 11.07.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.12.2017

(45) Опубликовано: 11.07.2018 Бюл. № 20

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),  
 Патова Елена Николаевна (RU),  
 Новаковская Ирина Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью  
 "СОЛИКСАНТ" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: RU 2555520 С2, 10.07.2015. US  
 005244921 А, 14.09.1993. БАЖУКОВА Н.В.,  
 НОВАКОВСКАЯ И.В., МАТИСТОВ Н.В.  
 "Использование микроводорослей  
*Eustigmatos magnus*, *Dictyococcus varians* и  
*Pseudococcomyxa simplex* как  
 перспективных объектов для  
 биотехнологии". // Материалы конференции  
 "Биотехнология. Взгляд в будущее", 26-27  
 марта 2013, Казань, с.11-13. (см. прод.)

(54) Штамм одноклеточной микроводоросли *Eustigmatos magnus* - продуцент эйкозапентаеновой кислоты

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Штамм одноклеточных микроводорослей *Eustigmatos magnus*, продуцирующий эйкозапентаеновую кислоту и нетребовательный к условиям выращивания, депонирован во Всероссийской коллекции

промышленных микроорганизмов ФГБУ «ГосНИИгенетика» Минобрнауки России под регистрационным номером ВКПМ А1-25. Изобретение обеспечивает высокий выход целевого продукта. 2 пр.

(56) (продолжение):

НОВАКОВСКАЯ И.В., ПАТОВА Е.Н. "Коллекция живых штаммов микроводорослей института биологии Коми НЦ УрО РАН и перспективы ее использования. // Известия Коми научного центра УрО РАН, 2012, Сыктывкар, выпуск 2 (10), с.36-41.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/12* (2006.01)  
*C12P 7/64* (2006.01)  
*C12R 1/89* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C12N 1/12 (2006.01); C12P 7/64 (2006.01); C12R 1/89 (2006.01)*(21)(22) Application: **2017143643, 13.12.2017**(24) Effective date for property rights:  
**13.12.2017**Registration date:  
**11.07.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **13.12.2017**(45) Date of publication: **11.07.2018 Bull. № 20**

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),  
Patova Elena Nikolaevna (RU),  
Novakovskaya Irina Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu  
"SOLIKSANT" (RU)**(54) **STRAINS OF SINGLE-CELL MICROALGAE EUSTIGMATOS MAGNUS - PRODUCT OF  
EICOSAPENTAENOIC ACID**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: strain of single-cell microalgae *Eustigmatos magnus*, producing eicosapentaenoic acid and undemanding to growing conditions, deposited in the All-Russian collection of industrial microorganisms Federal State Budgetary Institution State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial

Microorganisms "Genetika" of the Ministry of Education and Science of Russia under the registration number VKMP AI-25.

EFFECT: invention provides a high output of target product.

1 cl, 2 ex

RU 2 661 116 C1

RU 2 661 116 C1

## Область техники

Изобретение относится к области микробиологии, биотехнологии и аквакультуры и может быть использовано для получения эйкозапентаеновой кислоты.

## Уровень техники

5 Полиненасыщенные жирные кислоты — это жирные кислоты, молекулы которых имеют не менее двух двойных углерод-углерод связей. Они играют значительную роль в физиологии животных и человека, защищая организм человека от сердечно-сосудистых заболеваний, препятствуя развитию атеросклероза, регулируя воспалительные процессы в организме и способствуя снижению уровня холестерина.

10 Эйкозапентаеновая кислота, имеющая также тривиальное название тимнодоновая кислота, это полиненасыщенная жирная кислота класса омега-3. В организме человека она синтезируется из альфа-линоленовой кислоты, тем не менее, эффективность синтеза эйкозапентаеновой кислоты не очень высока. Более эффективным источником эйкозапентаеновой кислоты являются продукты питания, содержащие ее в повышенной  
15 концентрации (Williams C. M. Dietary fatty acids and human health //Annales de Zootechnie. – EDP Sciences, 2000. – Т. 49. – №. 3. – С. 165-180). Большое количество эйкозапентаеновой кислоты содержится в рыбьем жире, морских моллюсках и ракообразных, микроводорослях.

В настоящее время основным источником эйкозапентаеновой кислоты является  
20 рыбий жир, но из-за избыточного вылова промышленных видов морской рыбы в ближайшие годы ожидается снижение поступления эйкозапентаеновой кислоты из этого источника (Pauly D. et al. Towards sustainability in world fisheries //Nature. – 2002. – Т. 418. – №. 6898. – С. 689-695). Учитывая рост аквакультурного производства рыбы, моллюсков и ракообразных и тенденцию к снижению их вылова из природных водоемов, встает  
25 вопрос о создании стабильного промышленного метода производства эйкозапентаеновой кислоты и продуктов с ее высоким содержанием. Наиболее эффективным продуцентом эйкозапентаеновой кислоты являются микроводоросли. Они обладают наибольшим известным содержанием эйкозапентаеновой кислоты в расчете на сухую биомассу, могут выращиваться промышленным способом в  
30 фотобиореакторах и являются природным источником эйкозапентаеновой кислоты для личинок аквакультурных видов животных (Villalta M. et al. Effects of dietary eicosapentaenoic acid on growth, survival, pigmentation and fatty acid composition in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period //Aquaculture Nutrition. – 2008. – Т. 14. – №. 3. – С. 232-241). Для повышения содержания эйкозапентаеновой  
35 кислоты в личинках аквакультурных животных наибольшее значение имеют два параметра: (1) содержание эйкозапентаеновой кислоты в расчете на сухую биомассу корма и (2) размеры клеток. Оптимальной формой клетки является шарообразная форма, наиболее приемлемым размером микроводорослей для личинок ракообразных и моллюсков считается размер от 9 до 15 мкм (Brillant M. G. S., MacDonald B. A.  
40 Postingestive selection in the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin): the role of particle size and density //Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. – 2000. – Т. 253. – №. 2. – С. 211-227; Stenton-Dozey J. M. E., Brown A. C. Clearance and retention efficiency of natural suspended particles by the rock-pool bivalve *Venerupis corrugatus* in relation to tidal availability //Marine Ecology Progress Series. – 1992. – С. 175-186). Клетки меньшего размера неэффективно захватываются ротовым аппаратом личинок и, как следствие, не захватываются ими и не поступают в пищеварительный тракт. Если же размер клеток превышает размер ротового аппарата личинок, это также осложняет или делает  
45 невозможным их потребление.

Известен штамм эустигматовой микроводоросли *Nannochloropsis oceanica*, депонированный в NIVA (2/03), относящийся к размерному классу до 9 мкм и содержащий до 23.4 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Patil V. et al. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // Aquaculture International. – 2007. – Т. 15. – №. 1. – С. 1-9).

Известен штамм эустигматовой микроводоросли *Nannochloropsis oceanica* CY2, относящийся к размерному классу до 9 мкм и содержащий до 55 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Chen C. Y. et al. Engineering strategies for enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from an isolated microalga *Nannochloropsis oceanica* CY2 // Bioresource technology. – 2013. – Т. 147. – С. 160-167).

Известен штамм примнезиофитовой микроводоросли *Isochrysis aff. galbana* П-4, относящийся к размерному классу до 9 мкм и содержащий до 52.1 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Molina Grima E. et al. Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1994. – Т. 41. – №. 1. – С. 23-27).

Известен штамм примнезиофитовой микроводоросли *Pavlova* sp., депонированный в NIVA (4/92), относящийся к размерному классу до 9 мкм и содержащий до 18 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Patil et al., 2007).

Известен штамм примнезиофитовой микроводоросли *Pavlova* sp., депонированный в CSIRO (CS-50), относящийся к размерному классу до 9 мкм и содержащий до 35.2 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Martínez-Fernández E. et al. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae // Aquaculture. – 2006. – Т. 257. – №. 1. – С. 491-503).

Известен штамм родофитовой микроводоросли *Porphyridium cruentum*, депонированной в NIVA (1/92), относящийся к размерному классу до 9 мкм и содержащий 6.1 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Patil et al., 2007).

Известен штамм родофитовой микроводоросли *Porphyridium cruentum* SRP-6, относящийся к размерному классу до 9 мкм и содержащий 23.2 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Cohen Z. et al. Overproduction of  $\gamma$ -linolenic and eicosapentaenoic acids by algae // Plant physiology. – 1992. – Т. 98. – №. 2. – С. 569-572).

Известен штамм криптофитовой микроводоросли *Rhodomonas baltica*, депонированной в NIVA (5/91), относящийся к размерному классу 9-15 мкм и содержащий до 4.4 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Patil et al., 2007).

Известен штамм хлорофитовой микроводоросли *Tetraselmis suecica* депонированный в NIVA (3/92), относящийся к размерному классу 9-15 мкм и содержащий до 4.8 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Patil et al., 2007).

Известен штамм диатомовой микроводоросли *Chaetoceros muelleri*, депонированный в CSIRO (CS-176), относящийся к размерному классу 9-15 мкм и содержащий до 10.4 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Martínez-Fernández et al., 2006).

Известен штамм диатомовой микроводоросли *Chaetoceros* sp., депонированный в CSIRO (CS-256), относящийся к размерному классу 9-15 мкм и содержащий до 15.4 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Martínez-Fernández et al., 2006).

Известен штамм диатомовой микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum*, депонированный в NIVA (BAC 2), относящийся к размерному классу свыше 15 мкм и содержащий до 28.4 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Patil et al., 2007).

Известен штамм диатомовой микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* П242, полученный путем генной модификации, относящийся к размерному классу свыше 15

мкм и содержащий до 38.6 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса (Alonso D.L., Segura del Castillo C.I., Grima E.M., Cohen Z. First insights into improvement of eicosapentaenoic acid content in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) by induced mutagenesis // *Journal of phycology*. – 1996. – Т. 32. – №. 2. – С. 339-345).

5 Недостатком этих штаммов является размер клеток, превосходящий или меньший чем оптимальный для кормления личинок аквакультурных видов животных, либо недостаточно высокое содержание эйкозапентаеновой кислоты у микроводорослей размером 9-15 мкм, наиболее подходящих для кормления личинок аквакультурных животных.

10 **Раскрытие изобретения**

Задачей настоящего изобретения является получение штамма-продуцента эйкозапентаеновой кислоты, обладающего высоким содержанием эйкозапентаеновой кислоты, а также имеющего размеры клетки в диапазоне от 9 до 15 мкм.

15 Поставленная задача решается путем получения нового штамма одноклеточных микроводорослей *Eustigmatos magnus* ВКПМ А1-25 - продуцента эйкозапентаеновой кислоты.

Штамм *Eustigmatos magnus* депонирован в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ «ГосНИИгенетика» Министерства образования и науки РФ под регистрационным номером ВКПМ А1-25.

20 Предлагаемый штамм одноклеточной микроводоросли *Eustigmatos magnus* ВКПМ А1-25 в качестве продуцента эйкозапентаеновой кислоты имеет ряд преимуществ, которые обеспечивают технический результат настоящего изобретения, заключающийся в следующем:

- наибольшая известная концентрация эйкозапентаеновой кислоты в микроводорослях  
25 размерного класса 9-15 мкм – 53 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухого веса;  
- штамм не требователен к условиям выращивания и способен к росту в средах с низкой концентрацией солей.

Подробное описание изобретения

30 Штамм *Eustigmatos magnus* ВКПМ А1-25 был получен микробиологическим методом путем выделения на селективных средах. Выделение проводили следующим способом. Образцы природной почвы из Приполярного Урала высевали на селективную питательную среду. После 4 недель роста альгологически чистые культуры переносили в колбы, содержащие жидкую минеральную среду 3NBVM следующего состава:  $\text{NaNO}_3$   
– 75 мг,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 25 мг,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 75 мг,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 75 мг,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 175 мг,  $\text{NaCl}$   
35 - 25 мг, раствор микроэлементов (содержащий, г/л:  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  - 0.75,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 0.097,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 0.041,  $\text{ZnCl}_2$  - 0.005,  $\text{CoCl}_2$  - 0.002,  $\text{NaMoO}_4$  - 0.004) – 6 мл, водопроводная вода - 1 л (Andersen R. A. Appendix A: Recipes for freshwater and seawater media // *Algal culturing techniques*. – 2005. – С. 429-538). Инкубирование проводили при температуре  
40 25-30°C в течение 1 месяца при непрерывном и/или переменном освещении (120-150 мкмоль/м<sup>2</sup>·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 (Ettl H., Gärtner G. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. Stuttgart, 1995. 721 p.).

45 Хранение штамма одноклеточных водорослей *Eustigmatos magnus* ВКПМ А1-25 осуществляется на жидкой минеральной среде 3NBVM. Инкубирование проводили при температуре 10°C в течение 1 месяца при непрерывном и/или переменном освещении (120-150 мкмоль/м<sup>2</sup>·с), например, 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 3NBVM.

Штамм *Eustigmatos magnus* ВКПМ А1-25 характеризуется следующими культурально-морфологическими, физиологическими признаками и биологическими свойствами.

Культуральные свойства. На жидкой среде 3NBVM характеризуется ростом в виде зеленой взвеси. Степень чистоты культуры – альгологически чистая. Отсутствие водорослей других видов контролировали при световой фазово-контрастной микроскопии.

Морфологические признаки. Клетки имеют шаровидную форму, размером 6-14 мкм, большинство клеток имеет диаметр 10-11 мкм. Пиреноид полигональный, крупный, угловой, без обкладки и тилакоидов. Хроматофор чашевидной формы, с глубоко вырезанными лопастными краями. Размножается зооспорами и автоспорами, у зооспоры один жгутик, автоспоры образуются по 2-4. При длительном хранении происходит увеличение размеров клеток за счет вакуолизации, цитоплазма гранулируется, происходит обесцвечивание хлоропластов.

Молекулярная идентификация. Штамм идентифицирован до вида с помощью анализа участка 18S рРНК. По результатам проведенного анализа последовательности варибельного участка гена, кодирующего 18S рРНК, штамм наиболее близок к виду

*Eustigmatos magnus*:

```

TTTCTGGCGGGGACGGCTGGTGGGGCCCGTGAGGGTCTCTACTGACGCCTGGTTC
CCGTCATCCTCGGGGAGAGCGGCCCTGGCATTAAGTTGTTGGGGTTCGGGATCCTCGT
CTTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTAGGCCCTGAATACATTAG
CATGGAATAATAAGATATGACCTTGGTGGTCTATCTTGTGGTCTGTAGGACTGGAG
TAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTTCATTGTCAGAGGTGAAATT
CTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTA
ATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACC
ATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGTGGTTGCTATCTCAAGGCTCCATCGGCACCTA
ATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTT
AAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTC
AACACGGGGGAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTC
TTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTC
TGGTTAATTCGGTTAACGAACGAGACCCCCGCTGCTAACTAGTACCGGAAATGCTT
AGCATTGCCGGCGACTTCTTAGAGGGACTTTCGGTGGTTAGCCGAAGGAAGATGGG
GGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCCGCACGCGCGCTACACT
GATGCGTTCAACGAGTTTATAACCTTGTCCGGCAGGACTGGGTAATCTTGAAACGCG
CATCGTGATAGGGATAGATTCTTGCAACTATTGATCTTGAACGAGGGATTCCSTAGTA
AACGCGAGTC

```

Физиологические свойства. Штамм *Eustigmatos magnus* ВКПМ А1-25 способен к росту в диапазоне температур от 10 до 37°C, при непрерывном и/или переменном освещении (например, люминесцентными лампами) - 11-200 мкмоль/м<sup>2</sup>×с (например, с циклом 16 ч с перерывом 8 ч) на жидкой или агаризованной среде с содержанием агара от 0.5 до 2.5% с общим содержанием минеральных солей в среде менее 30 г/л. Оптимальными условиями для максимальной продукции эйкозапентаеновой кислоты штаммом *Eustigmatos magnus* ВКПМ А1-25 является жидкая минеральная среда 3NBVM следующего состава: NaNO<sub>3</sub> – 75 мг, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 25 мг, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 75 мг, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 75 мг, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 175 мг, NaCl - 25 мг, раствор микроэлементов (содержащий, г/л: Na<sub>2</sub>EDTA - 0.75, FeCl<sub>3</sub>

. 6H<sub>2</sub>O - 0.097, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O - 0.041, ZnCl<sub>2</sub> - 0.005, CoCl<sub>2</sub> - 0.002, NaMoO<sub>4</sub> - 0.004) – 6 мл, дистиллированная вода - 1 л. Наиболее предпочтительно наличие перемешивания, температура 25–30°C, непрерывное и/или переменное освещение (например, люминесцентными лампами) - 120 -150 мкмоль/м<sup>2</sup>×с (например, с циклом 16 ч с перерывом 8 ч).

В качестве источника CO<sub>2</sub> использует воздух с концентрацией углекислого газа 5% 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 *Eustigmatos magnus* ВКПМ А1-25 депонирован в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ «ГосНИИгенетика» Министерства образования и науки РФ под регистрационным номером ВКПМ А1-25.

Возможность применения на практике штамма одноклеточных водорослей *Eustigmatos magnus* ВКПМ А1-25 обуславливается его способностью продуцировать эйкозапентаеновую кислоту. Полученный штамм перспективен для создания на его основе биологически активной добавки (БАД), применяемой для непосредственного употребления в пищу, в качестве 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, пигментов, каротиноидов, в том числе антиоксидантов, 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 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 объем изобретения.

Пример 1. Производство биомассы, обогащенной эйкозапентаеновой кислотой, с использованием штамма *Eustigmatos magnus* ВКПМ А1-25.

При выращивании штамма в емкостях, содержащих среду 3NBVM, при переменном освещении 120 мкмоль/м<sup>2</sup>×с (16 ч с перерывом 8 ч) люминесцентными лампами и температуре 25°C максимальное содержание эйкозапентаеновой кислотой достигается на 14-й день культивирования и составляет 53 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухой биомассы. При этом максимальное содержание сухой биомассы составляет 4.2 г/л, что соответствует 222 мг эйкозапентаеновой кислоты на литр среды. После окончания выращивания среда, содержащая биомассу, центрифугируется, собранная биомасса лиофилизируется. При необходимости эйкозапентаеновая кислота может экстрагироваться из биомассы с использованием органических растворителей, таких как гексан, хлороформ-метанол, гексан-изопропанол и другие, или без использования растворителей с использованием сверхкритической углекислоты. Для определения

содержания эйкозапентаеновой кислоты в биомассе может быть использован метод газовой хромато-масс-спектрометрии на хроматографе Agilent 6890N с FID детектором и капиллярной колонкой DB-WAX (длина 30 м, диаметр 0.32 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм). Сбор и обработку данных проводят с помощью пакета программ «LabSolutions» с использованием персонального компьютера.

Пример 2. Использование биомассы, обогащенной эйкозапентаеновой кислотой, с использованием штамма *Eustigmatos magnus* ВКПМ А1-25 для кормления личинок креветок.

При выращивании штамма в емкостях, содержащих среду 3NBVM, при переменном освещении  $120 \text{ мкмоль/м}^2 \times \text{с}$  (16 ч с перерывом 8 ч) люминесцентными лампами и температуре  $25^\circ\text{C}$  максимальное содержание эйкозапентаеновой кислотой достигается на 14-й день культивирования и составляет 53 мг эйкозапентаеновой кислоты на грамм сухой биомассы. При этом максимальное содержание сухой биомассы составляет 4.2 г/л, что соответствует 222 мг эйкозапентаеновой кислоты на литр среды. После окончания выращивания среда, содержащая биомассу, центрифугируется, собранная биомасса лиофилизируется. Лиофилизованная биомасса, суспензия живых водорослей могут использоваться в полученном виде как компонент кормов, функционального питания и в других областях применения, не требующих использования очищенной эйкозапентаеновой кислоты. Например, для выращивания белоногой креветки (*Litopenaeus vannamei*) от стадии Зоеа 1 до Мизис 3 лиофилизованные водоросли добавляются в ёмкости с выращиванием креветок в пропорции 30% к стандартному корму (например, LANSY). Количество водорослей на  $20 \times 10^6$  личинок составляет 48 г, а стандартного корма – 96 г. Такой цикл выращивания занимает 9-10 дней. При кормлении пенеидных креветок (*Penaeidae*) на стадии Зоеа 1 – Мизис 3 живыми водорослями их количество, необходимое для питания, составляет  $30\text{-}35 \times 10^6$  клеток на литр. При выращивании двустворчатых моллюсков (устриц, мидий) живые водоросли добавляются из расчёта  $3\text{-}4 \times 10^6$  клеток на литр.

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.

#### (57) Формула изобретения

Штамм одноклеточной микроводоросли *Eustigmatos magnus* ВКПМ А1-25 - продуцент эйкозапентаеновой кислоты.