

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036192**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.13

(21) Номер заявки
201900121

(22) Дата подачи заявки
2019.03.22

(51) Int. Cl. **C12N 1/20** (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(54) ШТАММ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ CUPRIAVIDUS GILARDII GBS-15-1 - АССОЦИАНТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОЙ БЕЛКОВОЙ МАССЫ

(31) 2018134469

(32) 2018.10.02

(33) RU

(43) 2020.04.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ООО "ГИПРОБИОСИНТЕЗ" (RU)

(56) XIAOYU WANG et al., Genome Sequence Analysis of the Naphthenic Acid Degrading and Metal Resistant Bacterium Cupriavidus gilardi CR3, PLOS ONE, 24.08.2015, <DOI:10.1371/journal.pone.0132881>
SU-A-908085
WO-A1-2018144965

(72) Изобретатель:
Бабусенко Елена Сергеевна, Быков Валерий Алексеевич, Градова Нина Борисовна, Лалова Маргарита Витальевна, Левитин Леонид Евгеньевич, Сафонов Александр Иванович (RU)

(74) Представитель:
Князева Л.А. (RU)

(57) Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к штамму гетеротрофных бактерий *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 для получения белковой биомассы ассоциативной культурой, включающей метаноокисляющие бактерии и бактерии-гетеротрофы. Микробная белковая масса может быть использована в сельском хозяйстве для кормления животных, а также в качестве сырья для глубокой переработки. Техническим результатом изобретения является выявление нового штамма, который является ассоциантом метаноокисляющих бактерий и способен использовать продукты соокисления гомологов метана, присутствующие в природном газе. Технический результат достигнут при использовании штамма гетеротрофных бактерий *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1, депонированного во Всероссийской коллекции микроорганизмов при Институте биохимии и физиологии микроорганизмов Г.К.Скрябина РАН под регистрационным номером VKM В-3265D, в качестве компонента ассоциативной культуры метаноокисляющих бактерий для получения микробной белковой массы.

036192
B1

036192
B1

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к штамму гетеротрофных бактерий *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 для получения белковой биомассы ассоциативной культурой, включающей метанокисляющие бактерии и бактерии-гетеротрофы. Микробная белковая масса может быть использована в сельском хозяйстве для кормления животных, а также в качестве сырья для глубокой переработки.

На сегодняшний день общая картина в России по производству кормовых белков неблагоприятна. Согласно подписанной президентом России доктрины для обеспечения собственным продовольствием на 80-90% дефицит кормовых продуктов может составить не менее 2 млн тонн в год.

Основным источником белкового продукта является соевый шрот. Однако природные условия нашей страны не подходят для выращивания сои в достаточных количествах. Специалистам приходится искать другие способы производства кормового белка.

Среди продуцентов кормовой биомассы известны микроорганизмы, относящиеся к различным таксономическим группам, способные расти на различных субстратах.

Использование бактерий в качестве продуцентов кормового белка является более эффективным, так как бактерии накапливают до 79 мас.% белка, в то время как дрожжи - не более 60 мас.%.

В качестве продуцентов белка и биомассы применяют штаммы бактерий, известные как продуценты белка на основе метанола и относящиеся к роду *Acetobacter*. *Acetobacter methylicum* ВСБ-924 ЦМПМ В-2942 (патент РФ № 116363, С12N 15/00, 1984); *Acetobacter methylicum* ВСБ-867 ЦМПМ В-1947 (патент РФ № 925112, С12N 15/00, 1982); *Acetobacter methylovorans* ВСБ-914 ЦМПМ В-2479 (патент РФ № 1070916, С12N 15/00, 1983). Все штаммы характеризуются содержанием белка - до 76% к абсолютно сухому веществу (АСВ).

Штаммы различаются чувствительностью к типовым фагам и термоустойчивостью: оптимальный рост у *Acetobacter methylicum* ВСБ-867 при 28-30°C, у *Acetobacter methylicum* ВСБ-924 при 30-36°C и *Acetobacter methylovorans* ВСБ-914 при 36-40°C.

Однако при нестерильном культивировании в ферментере на ферментолитах отрубей и/или муки в кислой среде при pH ниже 6,0 происходит, как показали опыты, быстрое инфицирование дрожжами и грибами и вытеснение продуцента из процесса на 30-40% и более от общего числа клеток. В результате в получаемом продукте в сильной степени снижается содержание белка.

Одним из перспективных путей получения полноценного белкового кормового продукта является использование метанокисляющих бактерий. Метанотрофные бактерии в подходящих условиях активно перерабатывают метан природного газа, быстро размножаются и наращивают биомассу, богатую ценным белком, витаминами и иными биологически активными соединениями.

Использование метана природного газа для получения белка одноклеточных имеет ряд преимуществ по сравнению с жидкими углеводородами и другими субстратами, а именно большие запасы природного газа, хорошая его транспортабельность, возможность получения кормового продукта без дополнительной очистки от субстрата.

Учитывая, что в России большие газовые запасы недр, по некоторым данным они составляют до 40% мировых, внедрение микробиологического производства белка одноклеточных на российских предприятиях сулит не только экономический эффект, но и способно обеспечить продовольственную безопасность страны.

Облигатные метанокисляющие бактерии содержат фермент метанмонооксигеназу, который не является субстратспецифичным и может окислять не только метан, но и гомологи метана (например, этан, пропан и бутан), содержащиеся в природном газе.

В зависимости от состава природного газа видовых особенностей метанокисляющих бактерий и условий культивирования среди продуктов неполного окисления метана и его гомологов могут присутствовать в разных соотношениях в среде культивирования метанол, формальдегид, формиат, этанол, ацетальдегид, ацетат, пропионовый альдегид, пропионовая кислота, масляный альдегид. Данные продукты при их накоплении в среде культивирования в определенной концентрации оказывают ингибирующее воздействие на метанокисляющую культуру, на окисление метана.

Известен штамм *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 - продуцент кормовой биомассы. Штамм хранится в коллекции культур института "ВНИИГенетика" под коллекционным номером ЦМПМ В-1743 (авт. св. СССР № 770200). В качестве источника углерода и энергии штамм использует метан, как чистый, так и в составе природного газа. Недостатком данного штамма является его чувствительность к продуктам, образующимся при соокислении гомологов метана, которые неизменно в большем или меньшем количестве присутствуют в природном газе. Образующиеся продукты ингибируют рост продуцента.

Известен штамм *Cupriavidus eutrophus* ВКПМ В-10646 - продуцент полигидроксиалканоев (патент RU 2439143). В качестве ростового субстрата штамм использует глюкозу или фруктозу, или 3-масляную кислоту, или газовую смесь - водород, кислород и двуокись углерода.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому результату является штамм метанокисляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 регистрационный номер ВКПМ В-12549 во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (патент РФ 2613365).

Целью изобретения является повышение производительности и высокой продуктивности при культивировании метаноокисляющих бактерий в присутствии гетеротрофных бактерий в качестве ассоцианта продуцента микробной белковой массы.

Техническим результатом изобретения является выявление нового штамма, который является ассоциантом метаноокисляющих бактерий и способен использовать продукты соокисления гомологов метана, присутствующие в природном газе.

Технический результат достигнут при использовании штамма гетеротрофных бактерий *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1, депонированного во Всероссийской коллекции микроорганизмов при Институте биохимии и физиологии микроорганизмов Г.К. Скрыбина РАН под регистрационным номером VKM В-3265D, в качестве компонента ассоциативной культуры метаноокисляющих бактерий для получения микробной белковой массы.

Обозначение штамма, присвоенное депозитором GBS-15-1

Штамм *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 используется в качестве компонента ассоциативной культуры метаноокисляющих бактерий для промышленного получения на основе природного газа кормовой биомассы для кормления животных, а также в качестве сырья для глубокой переработки.

Заявляемый гетеротрофный штамм *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 выделен из ассоциации, включающей метаноокисляющие бактерии *Methylococcus capsulatus* ГБС-15. Для селекции быстрорастущей смешанной культуры бактерий была использована смесь активных накопительных культур, выделенных из подземных вод ряда газо- и нефтеносных районов Российской Федерации. В результате проведенной селекции получен штамм, который при культивировании метаноокисляющих бактерий в промышленных условиях на природном газе может быть использован как индивидуально, так в составе различных ассоциаций.

При ферментации штамм растет как ассоциант основного продуцента метаноокисляющих бактерий на минеральной среде и при физико-химических условиях оптимальных для продуцента потребляет продукты соокисления гомологов метана, присутствующие в природном газе, а также продукты метаболизма основного продуцента.

Штамм не является генетически модифицированным.

Вид *Cupriavidus gilardii* не значится в списках 1-4 групп патогенности (Приложение 1 "Классификация микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний..." к Санитарно-эпидемиологическим правилам СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами", в ред. Дополнений и изменений № 2, утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.06.2011 № 86).

Штамм *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 является авирулентным, не токсигенным, не токсичным и безвредным.

Полученный гетеротрофный штамм *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 характеризуется следующими признаками:

Культурально-морфологические: грамтрицательный; на питательном агаре (рН 7,0-7,2) формирует непрозрачные округлые колонии, светло-кремовые, с ровным краем, Ø 2-4 мм, консистенция мягкая, легко снимаются с агара; по форме клетки представляют собой палочки размером 0,3-0,5×0,9-1,2 мкм, неспорообразующие.

Физиолого-биохимические: штамм растет в диапазоне температур 30-47°C, оптимальная температура роста 32-35°C; границы физиологического действия рН в диапазоне 5,0-7,2; оптимальный диапазон рН 6,8-7,0; облигатный аэроб; стабильно сохраняет свои характеристики при варьировании условий культивирования и сред - замена источника углерода, низкие или высокие значения активной реакции среды, повышение температуры, изменение скорости протока (0,15-0,42 ч⁻¹); обладает широким потенциалом; использует в качестве источника углерода сахара, аминокислоты, органические кислоты, спирты; в качестве источника азота использует нитраты, соли аммония, аминокислоты; специфических факторов роста не требует.

Среда и условия культивирования.

Вариант 1. Минеральная среда.

Состав минеральной среды (г/л): (NH₄)₂SO₄ - 0,52; MgSO₄ - 0,02; K₂SO₄ - 0,06; NH₄H₂PO₄ - 1,53. Раствор микроэлементов (готовится отдельно) (г/л): ZnSO₄ - 0,43; MnSO₄ - 0,88; CuSO₄ - 0,78; H₃BO₃ - 0,4; Na₂MoO₄×2H₂O - 0,25; CoSO₄×7H₂O - 0,25; FeSO₄×7H₂O - 4,97. 1 мл приготовленного раствора микроэлементов добавить на 1000 мл минеральной среды.

Стерилизовать при температуре 121°C в течение 15 мин. рН доводят до 6,0-6,2. В качестве субстрата (источника углерода и энергии) могут быть использованы метанол, пропанол или этанол (0,5-1,0%). Температура культивирования 32-35°C; аэробные условия.

Вариант 2. Питательный бульон или питательный агар.

Питательный агар, состав (в пересчете на 1 л готовой среды): гидролизат ферментативный белковый, сухой - 10,5 г; пептон ферментативный, сухой - 10,5 г; экстракт автолизированных дрожжей осветленный - 2,0 г; натрий хлористый - 5,0 г; агар микробиологический -12,0 г. Стерилизовать при температуре 121°C в течение 15 мин.

Питательный бульон, состав (в пересчете на 1 л готовой среды): гидролизат ферментивный белковый, сухой - 9,1 г; пептон ферментативный сухой - 9,9 г; экстракт автолизированных дрожжей осветленный - 4,7 г; натрия хлористый - 5,0 г; натрий углекислый - 0,3 г.

Штамм хранят на питательном агаре при температуре $4\pm 2^\circ\text{C}$, пересевы осуществляются 1 раз в 3 месяца, возможно хранение штамма в лиофильно высушенном состоянии, а также в жидком азоте.

Для заявляемого штамма характерны:

устойчивый продуктивный рост на средах различного состава;

способность длительно сохранять активность в лиофилизированном состоянии;

отсутствие вирулентности, токсигенности, токсичности и безвредность.

Область применения штамма - производство белково-витаминных концентратов на основе метано-кисляющих бактерий, растущих на природном газе.

Гетеротрофные бактерии *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 выращивают совместно с метано-кисляющими бактериями *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 на минеральной питательной среде с метаном природного газа, при этом метано-кисляющие бактерии используют метан природного газа в качестве единственного источника углерода и энергии. Одновременно метано-кисляющие бактерии осуществляют соокисление гомологов метана (C_2 , C_3 , C_4) с образованием продуктов, ингибирующих рост метанотрофа. Гетеротрофные бактерии *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 используют образующиеся продукты (метанол, этанол, пропанол) в качестве источника углерода, тем самым снимая ингибирующее действие на основной продуцент. Кроме того, гетеротроф может использовать белки, аминокислоты и полисахариды, выделяющиеся в процессе лизиса основного продуцента.

Выращивание осуществляют преимущественно непрерывным способом при аэрировании среды смесью природного газа и кислородсодержащего газа, оптимальных значениях pH 5,6-5,8 и температуре $42-45^\circ\text{C}$. В среду для выращивания вводят гетеротрофные бактерии *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 в количестве 0,1-15% от общего числа клеток. Содержание метано-кисляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 в ассоциативной культуре составляет 85-99,9% при постоянной концентрации биомассы до 32 г/л. Метано-кисляющие бактерии развиваются за счет метана природного газа, а другой компонент ассоциативной культуры - за счет продуктов соокисления гомологов метана в природном газе и за счет продуктов жизнедеятельности метанотрофа.

Метано-кисляющие бактерии и гетеротрофные бактерии, не использующие метан, предварительно полученные отдельно обычными способами, предусмотренными для выращивания засеваемого материала, вносят в питательную среду одновременно. При этом количество засеваемых гетеротрофов, не окисляющих метан, может варьировать в пределах 0,1-15% от общего числа клеток. В процессе совместного выращивания их содержание независимо от величины засева находится на уровне, определяемом количеством используемых продуктов, образующихся в результате соокисления газообразных гомологов метана, находящихся в природном газе, так как на минеральной среде эти продукты являются единственным доступным источником углерода для не использующего метан компонента ассоциативной культуры. В результате такой саморегуляции культур в процессе выращивания начальное соотношение клеток культур в засеваемом материале не имеет существенного значения, но рекомендуется вносить не окисляющих метан микроорганизмов не менее 0,1% и не более 15% от общего числа клеток. Отклонение от этих значений в ту или иную сторону может привести в первом случае к задержке развития метано-кисляющих бактерий, а во втором - к задержке роста гетеротрофных бактерий. В смеси с подобранными не использующими метан бактериями выход биомассы увеличивается в 3-5 раз по сравнению с чистой культурой метано-кисляющих бактерий. Таким образом, добавление к метано-кисляющим бактериям подобранных не использующих метан гетеротрофов, растущих за счет продуктов соокисления гомологов метана, может повысить выход биомассы на метане. Добавление не окисляющих метан гетеротрофных бактерий не влияет на качество биомассы, так как даже при введении в высокой концентрации гетеротрофов, не использующих метан, их содержание в растущей культуре ограничивается количеством доступного источника углерода, которым являются продукты соокисления гомологов метана, и обычно не превышает 1-15% от общего числа клеток.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Штамм *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 (VKM-3265D) выращивают на жидкой минеральной среде, содержащей (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,52; MgSO_4 - 0,02; K_2SO_4 - 0,06; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ - 1,53.

Среду стерилизуют при температуре 121°C в течение 15 мин.

Раствор микроэлементов (готовят и стерилизуют отдельно) (г/л): ZnSO_4 - 0,43; MnSO_4 - 0,88; CuSO_4 - 0,78; H_2BO_3 - 0,4; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,25; $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,25; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 4,97. 1 мл приготовленного раствора микроэлементов добавляют на 1000 мл минеральной среды. pH доводят до 6,0-6,2. В качестве субстрата (источника углерода и энергии) используют метанол - 0,5%.

Культивирование штамма проводят в периодическом режиме в колбах из термостойкого стекла объемом 1 л при коэффициенте заполнения 0,3-0,4 в термостатируемой качалке. Культивирование проводят в течение 48 ч при 35°C и pH 6,8. По окончании культивирования концентрация сухих веществ 2-2,5 г АСВ/л. Полученную культуру используют в качестве инокулята для последующего выращивания

бактерий в автоматизированном ферментационном комплексе объемом 10 л (рабочий объем 7 л) или в ферментере эжекционного типа объемом 40 л (рабочий объем 28 л).

Пример 2. Культивирование штамма *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 проводят аналогично примеру 1, но в качестве источника углерода и энергии используют этанол - 0,8%, а в качестве питательной среды - бульон состава (в пересчете на 1 л готовой среды): гидролизат ферментативный белковый сухой - 9,1 г; пептон ферментативный сухой - 9,9 г; экстракт автолизированных дрожжей осветленный - 4,7 г; натрий хлористый - 5,0 г; натрий углекислый - 0,3 г. Физико-химические условия и время культивирования те же, концентрация сухих веществ - 4 г АСВ/л.

Пример 3. Штамм *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 выращивают на питательном бульоне, в который добавляют пропанол в концентрации 0,5 об.%. Культивирование штамма проводят в периодическом режиме в колбах из термостойкого стекла объемом 1 л при коэффициенте заполнения 0,3-0,4 в термостатируемой качалке. Культивирование проводят в течение 48 ч при 35°C и pH 6,8. По окончании культивирования концентрация сухих веществ 2,5-3,0 г АСВ/л. Полученную суспензию центрифугируют 7 мин при 8000 г. Затем осадок ресуспендируют в небольшом количестве физиологического раствора и используют в качестве инокулята для последующего выращивания бактерий в автоматизированном ферментационном комплексе объемом 10 л (рабочий объем 7 л) или в ферментере эжекционного типа объемом 40 л (рабочий объем 28 л).

Пример 4. Ассоциативную культуру, состоящую из метанооксиляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 и гетеротрофных бактерий *Cupriavidus gilardii* GBS-15-1 выращивают в автоматизированном ферментационном комплексе объемом 10 л (рабочий объем 7 л) на минеральной среде следующего состава (г/л): $\text{H}_3\text{PO}_4(80\%)$ - 17,2; K_2SO_4 - 5,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 4,0; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,21; CuSO_4 - 0,78; $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,38; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,06; H_3BO_3 - 0,25; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,009; $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0095.

В качестве источника азота и титрующего агента подают аммиачную воду. Процесс ведут при температуре 40-45°C, pH 5,0-6,0 и непрерывной подаче газовой смеси, содержащей метан и кислород. При достижении концентрации биомассы 10 г АСВ/л переходят на непрерывный процесс культивирования с коэффициентом разбавления среды $D=0,25 \text{ ч}^{-1}$. Доминирование метанооксиляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 составляло 90% при концентрации биомассы 15 г АСВ/л.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штамм гетеротрофных бактерий *Cupriavidus gilardii*, депонированный во Всероссийской коллекции микроорганизмов при Институте биохимии и физиологии микроорганизмов Г.К.Скрябина РАН под регистрационным номером VKM В-3265D, в качестве компонента ассоциативной культуры метанооксиляющих бактерий для получения микробной белковой массы.

