

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900128** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.30

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

(22) Дата подачи заявки
2019.03.28

**(54) ШТАММ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ STENOTROPHOMONAS ACIDAMINIPHILA
GBS-15-2 - АССОЦИАНТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОЙ БЕЛКОВОЙ МАССЫ**

(31) 2018136036

(32) 2018.10.11

(33) RU

(71) Заявитель:
ООО "ГИПРОБИОСИНТЕЗ" (RU)

(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 *Stenotrophomonas acidaminiphila* GBS-15-2 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, а также может использовать белки, аминокислоты и полисахариды, выделяющиеся в процессе лизиса бактерий. Технический результат достигнут при использовании штамма гетеротрофных бактерий *Stenotrophomonas acidaminiphila* GBS-15-2, депонированного во Всероссийской коллекции микроорганизмов при Институте биохимии и физиологии микроорганизмов Г.К. Скрыбина РАН под регистрационным номером VKM В-3264D, в качестве компонента ассоциативной культуры метаноокисляющих бактерий для получения микробной белковой массы.

A2

201900128

201900128

A2

**Штамм гетеротрофных бактерий *Stenotrophomonas acidaminiphila* GBS-15-2
ассоциант для получения микробной белковой массы**

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к штамму гетеротрофных бактерий *Stenotrophomonas acidaminiphila* GBS-15-2 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.

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 различные 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% белка по массе, в то время как дрожжи – не более 60%.

В качестве продуцентов белка и биомассы применяют штаммы бактерий, известные как продуценты белка на основе метанола и относящиеся к роду *Acetobacter*: *Acetobactermethylicum* ВСБ-924 ЦМПМ В-2942 (патент РФ №116363); *Acetobactermethylicum* ВСБ-867 ЦМПМ В-1947 (патент РФ № 925112); *Acetobactermethylovorans* ВСБ-914 ЦМПМ В-2479 (патент РФ № 1070916). Все штаммы характеризуются содержанием белка до 76% по АСВ.

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

Однако, при нестерильном культивировании в ферментере на ферментолизатах отрубей и/или муки в кислой среде при рН 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 метанооксиляющих 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 метанооксиляющие бактерии, содержат фермент метанмонооксигеназу, который не является субстратспецифичным и окисляет не только метан, но и гомологи метана (например, этан, пропан и бутан), содержащиеся в природном газе.

В зависимости от состава природного газа, видовых особенностей метанооксиляющих 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 определённой концентрации оказывают ингибирующее воздействие на метанооксиляющую культуру, на окисление метана.

Стабильное непрерывное культивирование на природном газе возможно только при использовании ассоциативной культуры метанооксиляющих микроорганизмов и гетеротрофных микроорганизмов - спутников, использующих продукты неполного окисления гомологов метана, возможно и продуктов автолиза клеток микроорганизмов.

В настоящее время установлено, что даже при использовании моносубстрата, в случае накопления в среде продуктов неполного окисления, целесообразно использовать не чистую культуру, а ассоциативную. При культивировании ассоциативной культуры

заметно повышается активность роста основной культуры и ее устойчивость к стрессовым воздействиям некоторых физико-химических параметров.

Известен штамм бактерий *Stenotrophomonas maltophilia* СНБС-3, обладающий способностью быстро утилизировать нефть и нефтепродукты (дизельное топливо, масло моторное, масло гидравлическое, газовый конденсат) в широком диапазоне температур от +5 до +37°C. Штамм бактерий *Stenotrophomonas maltophilia* депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов под регистрационным номером ВКПМ В-12247 и может быть использован как для очистки почвы, так и для очистки воды от загрязнений нефтью и нефтепродуктами (дизельное топливо, масло моторное, масло гидравлическое, газовый конденсат). Изобретение позволяет повысить эффективность и сократить сроки очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов в широком диапазоне температур от +5 до +37°C (РФ № 2617950).

Известен штамм *Stenotrophomonas acidaminiphila* ВJ1, используемый для биологического контроля болезней яблони (СNN№102851225).

Известен штамм *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 – продуцент кормовой биомассы. Штамм хранится в коллекции культур института «ВНИИГенетика» под коллекционным номером ЦМПМ В-1743 (авт. свид. 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.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому результату является штамм метанооксиляющих 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 на метансодержащем газе метанооксиляющих бактерий в присутствии гетеротрофных бактерий в качестве ассоцианта продуцента микробной белковой массы.

Техническим результатом изобретения является выявление нового штамма, который является ассоциантом метанооксиляющих бактерий и способен использовать продукты соокисления гомологов метана, присутствующие в природном газе, а также может использовать белки, аминокислоты и полисахариды, выделяющиеся в процессе лизиса бактерий.

Технический результат достигнут при использовании штамма гетеротрофных бактерий *Stenotrophomonas acidaminiphila* GBS-15-2, депонированного во Всероссийской коллекции микроорганизмов при Институте биохимии и физиологии микроорганизмов Г.К. Скрыбина РАН под регистрационным номером VKM В-3264Д, в качестве компонента ассоциативной культуры метаноокисляющих бактерий для получения микробной белковой массы.

Обозначение штамма, присвоенное депозитором GBS-15-2.

Штамм *Stenotrophomonas acidaminiphila* GBS-15-2 используется в качестве одного из компонентов ассоциативной культуры метаноокисляющих бактерий для промышленного получения на основе природного газа кормовой биомассы для кормления животных, а также в качестве сырья для глубокой переработки.

Источник выделения штамма: Штамм 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. 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.

Информация о биологической опасности (безопасности) штамма: вид *Stenotrophomonas acidaminiphila* 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 N 2, утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.06.2011 N 86).

Другие сведения о патогенности или вирулентности штамма: штамм *Stenotrophomonas acidaminiphila* GBS-15-2 является авирулентным, не токсигенным, не токсичным и безвредным.

ХАРАКТЕРНЫЕ ПРИЗНАКИ:

I. Культурально-морфологические: Грамотрицательный. На питательном агаре (рН 7,0-7,2) формирует непрозрачные колонии беловато-бежеватого цвета, с ровным краем, Ø 2-3 мм, консистенция мягкая, легко снимаются с агара. С возрастом могут образовывать коричневый пигмент. По форме клетки могут быть прямые или слегка изогнутые палочки, расположенные одиночно или парами, длиной от 0,5 до 1,5 мкм, неспорообразующие.

II. Физиолого-биохимические: Растет в диапазоне температуры 25-50°C, оптимальная температура роста 32-35°C; диапазон рН 5,0-8,0 оптимальное значение 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 потока (0,15-0,42 ч⁻¹). Обладает широким потенциалом. Использует для роста продукты лизиса штамма-продуцента (ГБС-15): полипептиды, аминокислоты, органические кислоты, спирты. Специфических факторов роста не требует.

Рекомендуемые среды и условия культивирования:

Варианты питательных сред:

Вариант 1:

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 – бутанол, пропанол или этанол (0,15-1,0%). 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 ферментативный 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. Стерилизовать при температуре 121°C в течение 15 мин.

Рекомендуемые метод и условия хранения: Штамм хранят на питательном агаре (при температуре 4 ± 2 °C), пересевы осуществляются 1 раз в 3 месяца, возможно хранение штамма в лиофильно высушенном состоянии, а также при температуре жидкого азота.

Таким образом, для заявляемого штамма характерны: устойчивый продуктивный рост на средах различного состава; способность длительно сохранять активность в лиофилизированном состоянии; отсутствие вирулентности, токсигенности, токсичности и безвредность

Штамм *Stenotrophomonas acidaminiphila* GBS-15-2 используется в качестве компонента ассоциативной культуры метанооксиляющих бактерий для промышленного получения кормовой биомассы на основе природного газа, а также в качестве сырья для глубокой переработки.

Гетеротрофные бактерии *Stenotrophomonas acidaminiphila* GBS-15-2 используют образующиеся продукты (этанол, пропанол, бутанол) 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 бактерий.

Метанооксиляющие 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.

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 содержания культур в процессе выращивания начальное соотношение клеток культур в засевном 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 метанооксиляющих 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 метанооксиляющих бактерий. Таким образом, добавление к метанооксиляющим 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.

Пример 1.

Штамм *Stenotrophomonas acidaminiphila* GBS-15-2 VKM-3264D 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 этанол – 1,0%.

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 6,2. По окончании культивирования концентрация сухих веществ 7 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 проводят аналогично Примеру 1, но в качестве источника углерода и энергии используют пропанол – 0,8%. Физико-химические условия и время культивирования те же, концентрация сухих веществ – 2,5 г АСВ/л.

Пример 3. Культивирование штамма проводят аналогично Примеру 1, но в качестве источника углерода и энергии используют бутанол – 0,15%. Физико-химические условия и время культивирования те же, концентрация сухих веществ – 0,8 г АСВ/л.

Пример 4. Ассоциативную культуру, состоящую из метанооксиляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 и гетеротрофных бактерий *Stenotrophomonas acidaminiphila* GBS-15-2 выращивают в автоматизированном ферментационном комплексе объемом 10 л (рабочий объем 7 л) на минеральной среде следующего состава (г/л): H_3PO_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 41-43°C, pH 5,5-5,7 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 92% при концентрации биомассы 16 г АСВ/л.

Пример 5. Ассоциативную культуру, состоящую из метанооксиляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 и гетеротрофных бактерий *Stenotrophomonas acidaminiphila* GBS-15-2 выращивают в ферментере эжекционного типа объемом 40 л (рабочий объем 28 л) на минеральной среде следующего состава (г/л): H_3PO_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 41-45°C, pH 5,5-5,7 и непрерывной подаче газовой смеси, содержащей метан и кислород. При достижении концентрации биомассы 10 г АСВ/л осуществляют постепенное повышение давления до 0,8 МПа. С увеличением давления постепенно увеличивают подачу газообразных источников питания микроорганизмов. При этом показатели процесса были следующими: $D=0,28 \text{ ч}^{-1}$, концентрация биомассы 43 г АСВ/л, доминирование метанооксиляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 93%.

ФОРМУЛА

Штамм гетеротрофных бактерий *Stenotrophomonas acidaminiphila* депонированный во Всероссийской коллекции микроорганизмов при Институте биохимии и физиологии микроорганизмов Г.К. Скрыбина РАН под регистрационным номером VKM В-3264D в качестве компонента ассоциативной культуры метаноокисляющих бактерий для получения микробной белковой массы.