

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900129** (13) **A1**

(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)
C12R 1/01 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.03.28

(54) ШТАММ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ *Klebsiella pneumonia* 1-17 АССОЦИАНТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОЙ БЕЛКОВОЙ МАССЫ

(31) 2018136037

(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 *Klebsiella pneumonia* 1-17 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 *Klebsiella pneumonia* 1-17, который является ассоциантом метаноокисляющих бактерий и способен использовать продукты соокисления гомологов метана, присутствующие в природном газе, а также продукты метаболизма основной культуры. Технический результат достигнут при использовании штамма гетеротрофных бактерий *Klebsiella pneumonia* 1-17, депонированного в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур "ГКПМ-ОБОЛЕНСК", под регистрационным номером В-8465 в качестве компонента ассоциативной культуры метаноокисляющих бактерий для получения микробной белковой массы.

A1

201900129

201900129

A1

Штамм гетеротрофных бактерий *Klebsiella pneumonia 1-17* ассоциант для получения микробной белковой массы

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к штамму гетеротрофных бактерий *Klebsiella pneumonia 1-17* для получения белковой биомассы ассоциативной культурой, включающей метанооксиляющие 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 не благоприятна. 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 N 116363, С 12 N 15/00, 1984); *Acetobactermethylicum* ВСБ-867 ЦМПМ В-1947 (патент РФ N 925112, С 12 N 15/00, 1982); *Acetobactermethylovorans* ВСБ-914 ЦМПМ В-2479 (патент РФ N 1070916, С 12 N 15/00, 1983). 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 их нестерильном культивировании в ферментере на ферментолизатах 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 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 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 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 *Klebsiella pneumoniae* ГИСК №214 продуцент фермента дезоксирибонуклеазы, на основе которого могут быть созданы лекарственные препараты (патент РФ №2057178). ДНК-азу получают путем выращивания штамма на жидкой или плотной питательной среде, осаждением биомассы, ультразвуковой дезинтеграцией и центрифугированием. Из надосадочной жидкости извлекают дезоксирибонуклеазу.

Известен штамм *Klebsiella azeanae* ВКМ В-2008Д продуцент эндонуклеазы рестрикции (патент РФ № 2044055). Данный фермент узнает и расщепляет последовательность нуклеотидов 5'-PuGGNC1CPy-3'. Рестриктаза, продуцируемая штаммом может найти применение в генно-инженерных исследованиях.

Известен штамм *Klebsiella pneumoniae* ГИСК №215, используемый в качестве референс-штамма для определения каталазной активности микроорганизмов при дифференциации патогенных и непатогенных микроорганизмов (патент РФ № 2070923).

Известен штамм *Klebsiella pneumoniae* ВКПМ В-7001, который содержит конъюгативную плазмиду pBK1, детерминирующую устойчивость данного сообщества микроорганизмов к соединениям мышьяка. Использование предложенного штамма позволяет получить штаммы бактерий-биодеструкторов соединений, содержащих мышьяк (патент РФ № 2260044).

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 штамма метанооксиляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 регистрационный номер ВКПМ В-12549 во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов для получения микробной белковой массы (патент РФ №2613365).

Целью изобретения является повышение производительности и достижение высокой продуктивности при культивировании на природном газометанооксиляющих

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 *Klebsiella pneumoniae* 1-17, депонированного в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – ОБОЛЕНСК» под регистрационным номером В-8465, в качестве компонента ассоциативной культуры метанооксиляющих бактерий для получения микробной белковой массы.

Обозначение штамма, присвоенное депозитором 1-17.

Штамм *Klebsiella pneumoniae* 1-17 используется в качестве одного из компонентов ассоциативной культуры метанооксиляющих бактерий для промышленного получения на основе природного газа кормовой биомассы для кормления животных, а также в качестве сырья для глубокой переработки.

Источник выделения штамма: заявляемый гетеротрофный штамм *Klebsiella pneumoniae* 1-17 выделен из ассоциации, включающей метанооксиляющие 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 метанооксиляющих бактерий в промышленных условиях на природном газе может быть использован в составе различных ассоциаций. При ферментации штамм растет как ассоциант основного продуцента метанооксиляющих 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 *Klebsiella pneumoniae* значится в списке IV группа 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 *Klebsiella pneumoniae* 1-17 является вирулентным, не токсигенным, не токсичным и безвредным.

ХАРАКТЕРНЫЕ ПРИЗНАКИ:

Обозначение штамма, присвоенное депозитором *Klebsiella pneumoniae* 1-17.

Методы и результаты идентификации: масс-спектрометрия MALDI Biotyper (Score Value 2,561), VITEK 2 (Вероятность 98%), секвенирование последовательности гена 16S – р РНК (99%), полногеномное секвенирование.

Морфологические признаки: грамтрицательные палочки размером 0,5-0,9×1,0-1,2 мкм, неподвижные, спор не образуют.

Культуральные особенности: на питательном агаре ГРМ №1 (ФБУН ГНЦ ПМБ) образует гладкие, полупрозрачные, слизистые колонии, 3-4 мм в диаметре.

Биохимические свойства: VITEK 2 Systems: 06.01 (bioMerieux) (табл.1):

Таблица 1.

№ п/п	Условное обозначение	Тест	Результат	№ п/п	Условное обозначение	Тест	Результат
1.	APPA	Ala-Phe-Pro-ариламидаза	-	25.	IARL	L-арабитол	-
2.	H ₂ S	продукция сероводорода	-	26.	dGLU	D-глюкоза	+
3.	BGLU	β-глюкозидаза	+	27.	dMNE	D-манноза	+
4.	PROA	пролинариламидаза	+	28.	TyrA	тирозинариламидаза	+
5.	SAC	сахароза	+	29.	CIT	цитрат натрия	+
6.	ILATK	L-лактат (алкализация)	+	30.	NAGA	β-N-ацетилгалактозаминидаза	-
7.	GlyA	глицин-ариламидаза	+	31.	IHISa	L-гистидин (ассимиляция)	-
8.	O129R	вибриостатический агент O/129 (2,4-диамино-6,7-диизопропилптеридин)	+	32.	ELLM	эллман	-
9.	ADO	адонитол	+	33.	dCEL	D-целлобиоза	+
10.	BNAG	бета-N-ацетилглюкозаминидаза	-	34.	GGT	гамма-глутамил-трансфераза	+
11.	dMAL	D-мальтоза	+	35.	BXYL	β-ксилозидаза	+
12.	LIP	липаза	-	36.	URE	уреаза	-
13.	dTAG	D-тагатоza	+	37.	MNT	маланат	+
14.	AGLU	α-глюкозидаза	-	38.	AGAL	α-галактозидаза	+
15.	ODC	орнитиндекарбоксилаза	-	39.	CMT	кумарат	+
16.	GGAA	Glu-Gly-Arg-ариламидаза	-	40.	ILATa	лактат (ассимиляция)	-
17.	PyrA	L-пирролидонариламидаза	+	41.	BGAL	β-галактозидаза	+
18.	AGLTr	глутамилариламидаза рN A	+	42.	OFF	ферментация глюкозы	+
19.	dMAN	D-маннитол	+	43.	BALap	β-аланинариламидаза рNA	-
20.	PLE	палатиноза	+	44.	dSOR	D-сорбитол	+
21.	dTRE	D-трегалоза	+	45.	5KG	5-кето-D-глюконат	-
22.	SUCT	Сукцинат (алкализация)	+	46.	PHOS	фосфатаза	+

№ п/п	Условное обозначение	Тест	Результат	№ п/п	Условное обозначение	Тест	Результат
23.	LDC	лизиндекарбоксилаза	+	47.	BGUR	β-глюкоронидаза	-
24.	IMLTa	L-малат (ассимиляция)	-				

Вирулентность для лабораторных животных: ЛД₅₀ для мышей линии BALB/c – 3,2×10⁸КОЕ

Устойчивость (чувствительность) к антибактериальным препаратам(табл. 2)

Таблица 2

Антибиотик	МИК, мкг/мл	Категория	Антибиотик	МИК, мкг/мл	Категория
Ампициллин	≥ 32	R	Амикацин	≤ 2	S
Ампициллин/сульбактам	4	S	Гентамицин	≤ 1	S
Цефуроксим	4	S	Тобрамицин	≤ 1	S
Цефуроксимаксетил	4	S	Налидиксовая кислота	≤ 2	S
Цефокситин	≤ 4	S	Ципрофлоксацин	≤ 0,25	S
Цефтазидим	≤ 1	S	Тетрацилин	≤ 1	S
Цефтриаксон	≤ 1	S	Тайгецилин	2	S
Цефоперазон/сульбактам	≤ 8	S	Нитрофурантоин	64	I
Цефепим	≤ 1	S	Хлорамфеникол	≤ 2	S
Имипенем	≤ 1	S	Бисептол	≤ 20	S
Эртапенем	≤ 0,5	S			

Генетические характеристики: сделано полногеномное секвенирование на платформе Illumina MiSeq. Количество полученных ридов – 2 087 324, количество проанализированных нуклеотидов – 469 180 422, количество контигов (программа SPAdes 3.11.1) – 531, общая длина полученных контигов – 5627276 пар нуклеотидов, средняя глубина покрытия – 88, GC состав – 57,01%.

В сборке контигов определена последовательность гена 16Sp PНК и проанализирована в базе данных BLAST Nucleotide collection (nr/nt) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Гомология гена 16SpPНК исследуемого штамма с геном 16S pPНК референсного штамма *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* HS11286 (CP003200.1) составляет 99% (1526/1527).

Последовательность участка гена 16Sp PНК штамма *Klebsiella pneumoniae* 1-17:

AGGTGATCCAACCGCAGGTTCCCTACGGTTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCA
TGAATCACAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTGCAA
CCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGT
AGCATTCTGATCTACGATTAAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACT
ССААТССГГАСТАСГАСАТАСТТТАТГАГГТССГСТТГСТСТСГСГАГГТСГСТТСТ
СТТТГТАТАТГССАТТГТАГСАСГТГТГАССТТГТСГТААГГГССАТГАТГАСТ
ТГАСГТСАТСССАССТТСТССАГТТТАССТТГСАГТСТССТТТГАГТТСССГС
СГААССГСТГГСААСАААГГАТААГГГТТГСГСТСГТТГСГГГАСТТААСССАА
ТТСАСААСАСГАСГТГАСГАСАГССАТГАСГАССТТГТСТСАСАГТТСССГААГГ
АССААТССАТСТТГГАААГТТСТТГТГГАТГТСААГАССАГГТААГГТТСТТСГСГ
ТГАТСГААТТААСССАТГАСТССАССГСТТГТГСГГГССССГТСААТТСАТТТГ

AGTTTTAACCTTGCGGCCGTA CTCCCCAGGCGGTTCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGA
AGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCC
AGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACA
CCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCC
CAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCCGCTGCGTGCGCTTTAC
GCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGG
AGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCGATGAGGTTATTAACCTTACG
CCTTCCTCCCCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTACACACGCGGCA
TGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGG
ATCGTCGCCTAGGTGAGCCGTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATC
TGATGGCATGAGGCCCGAAGGTCCCCCACTTTGGTCTTGCGACATTTATGCGGTATTA
GCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCCAGACATTA CTACC
CGTCCGCCGCTCGTCACCCGAGAGCAAGCTCTCTGTGCTACCGCTCGACTTG CATGT
GTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAA ACTCT

Условия культивирования: плотная или жидкая питательная среда- ГРМ №1, ГРМ-бульон, питательный агар или питательный бульон, 34°C, 24 часа; минеральная среда, в которую в качестве источника углерода вносят либо метанол, либо этанол, либо пропанол, 40°C, 36-48 часов.

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.

ГРМ-№1 (состав среды, г/л): панкреатический гидролизат рыбной муки - 15,0, панкреатический гидролизат казеина - 10,0, дрожжевой экстракт - 2,0, натрия хлорид - 3,5, Д-глюкоза - 1,0, агар 10,0±2.

ГРМ - бульон (состав среды, г/л): панкреатический гидролизат рыбной муки – 8,0, пептон сухой ферментативный – 8,0, натрия хлорид – 4,0

Минеральная среда (состав среды, 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. Раствор микроэлементов (готовится отдельно) (г/л): ZnSO_4 – 0,43; MnSO_4 – 0,88; CuSO_4 – 0,78; H_3BO_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 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 (до 1,5% об.), этанол (до 2% об.), пропанол (до 1% об.). Температура культивирования 40°C; аэробные условия.

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 в жидком азоте.

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 *Klebsiella pneumoniae* 1-17 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 *Klebsiella pneumoniae* 1-17 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 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 метаноокисляющих бактерий. Таким образом, добавление к метаноокисляющим 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 *Klebsiella pneumoniae* 1-17 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_3BO_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 – 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 34°C и pH 6,0. По окончании культивирования концентрация сухих веществ 8,2 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 этанол – 1,6%. Физико-химические условия и время культивирования те же, концентрация сухих веществ – 10 г АСВ/л.

ПРИМЕР 3. Культивирование штамма проводят аналогично Примеру 1, но в качестве источника углерода и энергии используют пропанол – 0,5%. Физико-химические условия и время культивирования те же, концентрация сухих веществ – 3,0 г АСВ/л.

ПРИМЕР 4. Ассоциативную культуру, состоящую из метаноокисляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 и гетеротрофных бактерий *Klebsiella pneumoniae* 1-17 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;

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 4,0$; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,21$; $\text{CuSO}_4 - 0,78$; $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O} - 0,38$; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,06$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,25$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0,009$; $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,0095$.

В качестве источника азота и титрующего агента подают аммиачную воду. Процесс ведут при температуре 40-45°C, pH 5,4-5,8 и непрерывной подаче газовой смеси, содержащей метан и кислород. При достижении концентрации биомассы 9 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 93% при концентрации биомассы 18,5 г АСВ/л.

ПРИМЕР 5. Ассоциативную культуру, состоящую из метанооксиляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 и гетеротрофных бактерий *Klebsiella pneumoniae* 1-17 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; $\text{K}_2\text{SO}_4 - 5,0$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 4,0$; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,21$; $\text{CuSO}_4 - 0,78$; $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O} - 0,38$; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,06$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,25$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0,009$; $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0,0095$.

В качестве источника азота и титрующего агента подают аммиачную воду. Процесс ведут при температуре 41-45°C, pH 5,4-5,7 и непрерывной подаче газовой смеси, содержащей метан и кислород. При достижении концентрации биомассы 9-10 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: $D=0,30 \text{ ч}^{-1}$, концентрация биомассы 37 г АСВ/л, доминирование метанооксиляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 93%.

ФОРМУЛА

Штамм гетеротрофных бактерий *Klebsiella pneumonia 1-17* депонированный в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – ОБОЛЕНСК» под регистрационным номером В-8465, в качестве компонента ассоциативной культуры метанооксиляющих бактерий для получения микробной белковой массы.

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

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

Номер евразийской заявки:
201900129

Дата подачи: 28 марта 2019 (28.03.2019)		Дата испрашиваемого приоритета: 11 января 2018 (11.01.2018)	
Название изобретения: ШТАММ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ KLEBSIELLA PNEUMONIA 1-17 АССОЦИАНТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОЙ БЕЛКОВОЙ МАССЫ			
Заявитель: ООО "ГИПРОБИОСИНТЕЗ"			
<input type="checkbox"/> Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа) <input type="checkbox"/> Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)			
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:			
МПК:	C12N 1/20 (2006.01)	СПК:	C12N 1/20 (2016-05)
	C12P 21/00 (2006.01)		C12P 21/00 (2013-01)
	C12R 1/01 (2006.01)		C12R 1/01 (2013-01)
Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК			
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:			
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК) C12N 1/20, C12P 21/00, C12R 1/01			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:			
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ			
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей		Относится к пункту №
A	RU 2221864 C2 (МОСКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИИ ИМ. К.И. СКРЯБИНА) 20.01.2004		1
A	US 5876982 A (BIOEUROPE) 02.03.1999		1
A	US 3930947 A (AJINOMOTO CO., INC.) 06.01.1976		1
<input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы В			
<input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении			
* Особые категории ссылочных документов:			
"А" документ, определяющий общий уровень техники		"Г" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения	
"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее		"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности	
"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.		"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории	
"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета		"&" документ, являющийся патентом-аналогом	
"D" документ, приведенный в евразийской заявке		"L" документ, приведенный в других целях	
Дата действительного завершения патентного поиска:		03 сентября 2019 (03.09.2019)	
Наименование и адрес Международного поискового органа:		Уполномоченное лицо :	
Федеральный институт промышленной собственности		Т. Ф. Владимирова	
РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		 Телефон № (499) 240-25-91	