

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040261**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.16

(21) Номер заявки
201700497

(22) Дата подачи заявки
2016.05.04

(51) Int. Cl. **C07K 14/195** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 1/22 (2006.01)

(54) **СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ AKKERMANSIA MUCINIPHILA**(31) **15166598.1**(32) **2015.05.06**(33) **EP**(43) **2018.05.31**(86) **PCT/EP2016/060039**(87) **WO 2016/177801 2016.11.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ВАГЕНИНГЕН УНИВЕРСИТЕТ (NL)

(72) Изобретатель:
Белзер Клара, Де Вос Виллем (NL)

(74) Представитель:
Баландина Л.А. (RU)

(56) M. DERRIEN ET AL.: "Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 54, no. 5, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 1469-1476, XP55074486, ISSN: 1466-5026, DOI: 10.1099/ijs.0.02873-0 page 1473, column 2, lines 6-12 page 1469 - page 1470

S. LUKOVAC ET AL.: "Differential Modulation by Akkermansia muciniphila and Faecalibacterium prausnitzii of Host Peripheral Lipid Metabolism and Histone Acetylation in Mouse Gut Organoids", MIBIO, vol. 5, no. 4, 12 August 2014 (2014-08-12), pages e01438-14, XP055279866, DOI: 10.1128/mBio.01438-14 page 8, column 2, lines 14-19
Noora A. Ottman: "Host immunostimulation and substrate utilization of the gut symbiont Akkermansia muciniphila", PhD thesis at Wageningen University, Wageningen, NL, 16 September 2015 (2015-09-16), XP002758738, Retrieved from the Internet: URL: <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/354248#page=50> [retrieved on 2016-06-13] page 57; table 2

BONG-SOO KIM ET AL.: "In Vitro Culture Conditions for Maintaining a Complex Population of Human Gastrointestinal Tract Microbiota", JOURNAL OF BIOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY, vol. 1, no. 8335, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 1206-10, XP055263716, US ISSN: 1110-7243, DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01717.x table 1

(57) В патенте описан рентабельный и эффективный способ культивирования бактерий *Akkermansia muciniphila*. Возможно получение высокого выхода биомассы в средах с заданным химическим составом. Это позволяет в промышленном масштабе получать бактерии *A. muciniphila*, применимые для человека, например, для использования в фармацевтической или пищевой промышленности. Бактерии *A. muciniphila* могут быть получены без использования продуктов животного происхождения, что позволяет применять их в широком диапазоне.

B1**040261****040261 B1**

Область техники, к которой относится изобретения

Настоящее изобретение относится к культивированию бактерий *Akkermansia muciniphila*.

Предшествующий уровень техники

Бактерии рода *Akkermansia*, в частности, вида *Akkermansia muciniphila* предположительно играют важную роль в предотвращении и/или лечении нарушений обмена веществ, таких как, например, связанные с ожирением нарушения (WO2014/075745; WO 2014/077246). Было обнаружено, что пероральное введение *A. muciniphila* мышам, получавшим контрольный рацион или рацион с высоким содержанием жира, нормализовало алиментарную метаболическую эндотоксемию, ожирение и маркер CD11c жировой ткани без каких-либо изменений в приеме пищи (WO 2014/075745). Кроме того, лечение бактериями *A. muciniphila* снижало массу тела и улучшало состав тела (т.е. соотношение жира и мышечной массы). Было обнаружено, что при рационе с высоким содержанием жира лечение бактериями *A. muciniphila* повышало экспрессию маркеров дифференциации адипоцитов в мРНК и окисление липидов без влияния на липогенез. Было также обнаружено, что в результате колонизации бактериями *A. muciniphila* полностью прекращалась алиментарная гипергликемия, и после лечения также снижался индекс инсулинорезистентности. Наконец, было обнаружено, что *A. muciniphila* усиливают барьерную функцию кишечника (J Reunanen и др., 2015, Appl Environ Microbiol. 81:3655-62). Было предложено использовать бактерии рода *Akkermansia*, в частности, вида *A. muciniphila*, в пищевой или фармацевтической промышленности. При этом желательны высокие уровни выхода биомассы *Akkermansia*.

В статье Derrien и др. (2004, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1469-76) говорится, что из бактерий *A. muciniphila* может быть выделен штамм MucT и выращен в базальной аэробной среде, содержащей муцин желудочной слизи свиньи в качестве единственного источника углерода и азота. Авторы также пишут, что *A. muciniphila* могут выращиваться в жирных средах, таких как колумбийский бульон (Columbia Broth (CB)) и бульон с сердечно-мозговым экстрактом (Brain Heart Infusion (BHI)), но при этом получаемая конечная оптическая плотность составляет половину конечной оптической плотности, которая может быть получена при использовании муциновой среды. Все известные до сих пор среды, применимые для культивирования *Akkermansia*, содержат компоненты животного происхождения. BHI выделен из животной ткани, а CB содержит продукты ферментативного расщепления казеина коровьего молока, животной ткани, и сердечной мышцы. Бактерии *A. muciniphila* сложны для культивирования, что подтверждается наблюдаемым отсутствием их роста на жирном бульоне Уилкинса-Чалгрена (Wilkins-Chalgren Broth (WCB)) (Derrien и др., 2004). WCB разработан специально для выращивания анаэробных бактерий и содержит, в том числе, продукты ферментативного расщепления казеина коровьего молока и желатина животного происхождения.

Кроме того, описано, что бактерии *A. muciniphila* не способны расти в базальной солевой среде с одним из следующих соединений (в каждом случае по 10 мМ, если не указано иное): глюкозой, целлобиозой, лактозой, галактозой, ксилозой, фукозой, рамнозой, мальтозой, сукцинатом, ацетатом, фумаратом, бутиратом, лактатом, казитонем (0,5%), казаминовыми кислотами (0,5%), триптоном (0,5%), пептоном (0,5%), дрожжевым экстрактом (0,5%), пролином, глицином, аспаратом, серином, треонином, глутаматом, аланином, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин (Derrien и др., 2004).

Тем не менее, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин или глюкоза (в каждом случае по 10 мМ) поддерживали рост только при добавлении в базальную среду по 2 г/л (0,2%) пептона, дрожжевого экстракта, триптона и казитона, но рост составлял менее четверти роста в муциновой среде (Derrien и др., 2004).

В одном из недавних исследований, опубликованном через 10 лет после его проведения, выращивали *A. muciniphila* в базальной среде, содержащей 10 г/л казитона (соответствует 1%), 5 мМ глюкозы, 5 мМ фукозы и 1 мМ треонина (Lukovac и др., 2014, MBio. 12;5(4). pii: e01438-14. (doi: 10.1128/mBio.01438-14)). И в этом случае рост являлся небольшим, приблизительно в четыре раза меньшим, чем при выращивании *A. muciniphila* в содержащей слизь среде. Кроме того, среда имела высокое содержание казитона, который является продуктом протеолитического распада казеина белка коровьего молока и, следовательно, имеет животное происхождение. Наконец, в качестве сахара в среде использовалась не только дешевая глюкоза, но также фукоза, которая в основном содержится в продуктах животного происхождения, а ее стоимость более чем 100 выше, чем у глюкозы.

Следовательно, очевидно, что бактерии *A. muciniphila* сложно культивировать, и все описанные до сих пор среды и условия роста предусматривают использование соединений животного происхождения. Продукты животного происхождения могут содержать загрязнители вирусного, прионового или бактериального происхождения или аллергены, антигенные пептиды или другие нежелательные вещества, или могут по иным причинам могут считаться неприемлемыми для культивирования *Akkermansia* в целях пищевого или фармацевтического применения человеком, например, поскольку они не являются кошерными или халяльными. До настоящего времени считалось, что содержащие слизь среды обеспечивают наибольший выход биомассы. Поскольку источником слизи являются только животные, это налагает ограничения на культивирование *A. muciniphila* и препятствует применению этих бактерий с целью улучшения здоровья людей и животных, как предложено в существующей научной и патентной литературе. Кроме того, не описаны какие-либо изоляты *A. muciniphila* помимо штамма MucT. Признано, что

культивирование и выделение *A. muciniphila* является сложной задачей, как это недавно продемонстрировано в одном из исследований, в котором вопреки значительным усилиям была получена лишь обогащенная, а не чистая культура *A. muciniphila* (Caruto и др., 2015, Biol Direct 10: 5 (doi:10.1186/s13062-015-0041-1)), что говорит о том, что ее культивирование связано с серьезными сложностями.

В основу настоящего изобретения положена задача создания композиции, которая могла бы использоваться для культивирования бактерий *Akkermansia muciniphila* с достижением высокой конечной оптической плотности (высокого выхода биомассы), и/или которая является менее сложной по сравнению с известными композициями для культивирования бактерий рода *Akkermansia* и предпочтительно не содержит продуктов животного происхождения. Такая культуральная среда позволила бы в больших количествах получать бактерии *Akkermansia*, применимые для человека, например, для использования в пищевой, кормовой или фармацевтической промышленности.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложен способ культивирования бактерий *Akkermansia muciniphila*, включающий стадии использования композиции, содержащей моносахарид, азотосодержащее производное моносахарида и источник аминокислоты; инокуляции упомянутой композиции бактериями *Akkermansia muciniphila*; и размножения бактерий *Akkermansia*.

Азотосодержащее производное моносахарида предпочтительно является N-ацетил-глюкозамин (Glc-Nac). Glc-Nac предпочтительно может присутствовать в количестве 25-40 мМ.

Моносахаридом предпочтительно является глюкоза. Глюкоза может присутствовать, например, в количестве 10-25 мМ.

Композиция может дополнительно содержать треонин, например, в количестве 2-4 мМ.

Источник аминокислоты в композиции может выбираться из источника аминокислоты растительного происхождения, источника аминокислоты микробного происхождения или сочетания аланина, глутамата, пролина и серина. В одном из вариантов осуществления источником аминокислоты является гидролизат растительного белка, такой как гидролизат соевого белка, гидролизат горохового белка, гидролизат пшеничного белка, гидролизат рисового белка, гидролизат хлопкового белка и т.п.

Гидролизат растительного белка может присутствовать в количестве от около 0,01 г/л до около 1 кг/л, например, от около 0,05 до около 500 г/л, от около 0,1 до около 250 г/л, от около 0,5 до около 150 г/л, от около 1 до около 100 г/л или от около 2 до около 80 г/л.

Подробное описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что *Akkermansia muciniphila* можно культивировать с достижением очень высокой оптической плотности в композиции, содержащей глюкозу, N-ацетил-глюкозамин и источник аминокислоты. Источником аминокислоты в идеале может являться источник целиком растительного или микробного происхождения.

Таким образом, в настоящем изобретении также предложена композиция для культивирования бактерий, а именно, рода *Akkermansia*, в частности *Akkermansia muciniphila*, содержащая моносахарид, азотосодержащее производное моносахарида и источник аминокислоты.

Моносахаридом может являться любой моносахарид, в частности, моносахарид, который широко применяется для экономически эффективного культивирования бактерий, предпочтительно глюкоза.

Азотосодержащее производное моносахарида предпочтительно представляет собой N-ацетил-глюкозамин.

Композиция может содержать моносахарид, такой как глюкоза, в количестве 10-25 мМ.

Композиция может содержать азотосодержащее производное моносахарида, такое как Glc-Nac, в количестве 25-40 мМ.

Композиция согласно настоящему изобретению может не содержать продуктов животного происхождения.

Источником аминокислоты может являться любой известный специалистам источник аминокислоты, включая без ограничения источник аминокислоты животного происхождения, растительного происхождения или источник, выделенный из микроорганизма. Источником аминокислоты может являться, например, гидролизат белка, такой как гидролизаты белков растительного происхождения. Гидролизаты получают из источников белка путем (частичного) гидролиза, при этом они обычно состоят из смеси пептидов, аминокислот, углеводов и липидов, а также множества неустановленных компонентов с неясной биологической активностью. Их часто получают путем ферментативного, щелочного или кислотного расщепления заданного сырья из различных источников, таких как без ограничения растительные источники, например, соя, пшеница, горох, нут или хлопчатник.

Источник аминокислоты может включать промышленные источники аминокислот, такие как дрожжевые экстракты, например, подвергнутый ультрафильтрации НуРер™ YE или UltraPep™ YE или Ну-Yest™; гидролизаты молочных продуктов, например, полученные из казеина, лактальбумина и гидролизаты сухого вещества молока, такие как Amicase™, Ну-Case™ Amino, Ну-Case™ SF, N-Z-Amine™ A, N-Z-Amine™ AS, N-Z-Amine™ ЕКС, N-Z-Case™ Plus, N-Z-Case™ TT, Edamin F или триптон (набор пептидов, полученных путем расщепления казеина протеолитическим трипсином); гидролизаты растительных

белков, такие как НуРер 1510™ (ферментативный гидролизат сои), НуРер 1511™ (подвергнутый ультрафильтрации продукт ферментативного расщепления сои), НуРер 1512™ (продукт ферментативного расщепления сои), НуРер 4601N™ (подвергнутый ультрафильтрации продукт ферментативного расщепления пшеничного глютенa), НуРер 5603™ (подвергнутый ультрафильтрации продукт ферментативного расщепления рисового белка и пшеничного глютенa), НуРер 7504™ (подвергнутый ультрафильтрации продукт ферментативного расщепления хлопкового белка), UltraPep Cotton™, Amisoy (продукт кислотного расщепления изолята сои в виде смеси аминокислот и маломолекулярных пептидов, но без триптофана), Phytone или Soytone Peptones (пептоны марок Difco™ и BBL) или UltraPep Soy™. Источником аминокислоты также может являться аминокислотная композиция, содержащая отдельную аминокислоту или сочетание отдельных аминокислот. В одном из вариантов осуществления источником аминокислоты является источник аминокислоты растительного происхождения.

Источник аминокислоты может содержаться в композиции согласно изобретению в количестве от около 0,01 г/л до около 1 кг/л, например, от около 0,05 до около 500 г/л, от около 0,1 до около 250 г/л, от около 0,5 до около 150 г/л, от около 1 до около 100 г/л или от около 2 до около 80 г/л. Например, НуSoy или Amisoy может содержаться в композиции согласно изобретению предпочтительно в количестве 16 г/л.

Композиция согласно изобретению предпочтительно содержит треонин, например, в количестве 2-4 мМ. Треонин может присутствовать в форме L-треонина или D,L-треонина.

Кроме того, композиция согласно изобретению может содержать аланин, глутамат, пролин и серин, предпочтительно каждый в количестве от около 0,01 до около 100 мМ, предпочтительно от около 0,05 до около 50 мМ, более предпочтительно от около 0,1 до около 25 мМ, еще более предпочтительно от около 0,5 до около 15 мМ, наиболее предпочтительно от около 1 до около 10 мМ, например, от около 1 мМ до около 8 мМ.

В одном из вариантов осуществления композиция согласно изобретению дополнительно содержит буферную систему для поддержания рН в интервале 5,5-8,0, предпочтительно 6,0-7,0, более предпочтительно около 6,6. Специалист способен выбрать буферную систему для этих целей.

В одном из вариантов осуществления композиция согласно изобретению дополнительно содержит от около 0,1 до около 2%, например, от около 0,3 до около 1,5% или от около 0,5 до около 1,3% или около 1,0% цистеина.

Хотя это не требуется, в композицию согласно изобретению могут добавляться витамины. Применимые витамины, которые могут добавляться, включают без ограничения биотин, кобаламин, ПАВА, фолиевую кислоту, пиридоксамин и т.п. Например, кобаламин может использоваться, когда желаемым конечным продуктом метаболизма посредством кобаламин-зависимой метилмалонил-СоА-мутазы является пропионат, а не сукцинат.

В настоящем изобретении также предложен способ культивирования бактерий *Akkermansia muciniphila*, включающий стадии: использования композиции согласно изобретению, инокуляции упомянутой композиции бактериями *Akkermansia muciniphila*; и размножения бактерий рода *Akkermansia*.

Применимые условия культивирования *Akkermansia muciniphila* включают без ограничения температуру в интервале 20-40°C и рН в интервале 5,5-8,0, при этом оптимальными для роста являются температура около 36-38°C и рН 6,0-7,0, предпочтительно около 6,5. Поскольку *Akkermansia muciniphila* являются строго анаэробными бактериями (Derrien и др. 2004. *Int J System Evol Microbiol* 54:1469-1476), в идеале должны обеспечиваться в максимальной степени анаэробные условия и в максимальной степени предотвращаться контакт с воздухом. Способы анаэробного культивирования известны специалистам.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано, но не ограничено следующими примерами.

Из приведенного выше описания и этих примеров специалисты смогут выявить существенные признаки настоящего изобретения и смогут предложить различные изменения и модификации, не выходящие за пределы его идей и объема, с целью его приспособления к различным применениям и условиям. Так, из приведенного выше описания специалистов станут ясны различные модификации изобретения помимо тех, которые рассмотрены и описаны в нем. Предполагается, что такие модификации также входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Глюкоза и N-ацетилглюкозамин стимулируют рост *A. muciniphila*.

Вырастили *A. muciniphila* Muc^T (АТТС ВАА-835) в ранее описанной базальной анаэробной среде (смотри выше Derrien и др., 2004). Дополнили среду только очищенной слизью свиньи (тип III; Sigma; 0,5%), только слизью (0,25%) или слизью с добавлением Сахаров или триптоном (Difco; 1%) с добавлением Сахаров. В качестве Сахаров использовали только D-глюкозу (глюкозу), D-фукозу (фукозу) или N-ацетилглюкозамин (GlcNac) при концентрации 20 мМ или их сочетание при конечной концентрации 10 мМ, соответственно. При инкубации с сахарами также использовали 1 мМ D,L треонина (треонина). Инкубацию во всех случаях осуществляли в бутылках с сывороточным бульоном, укуренных пробками из бутилкаучука, при температуре 37°C в анаэробных условиях, обеспеченных газообразной фазой

N_2/CO_2 под давлением 182 кПа (1,8 атм). Определяли рост методами спектрофотометрии как оптическую плотность на волне длиной 600 нм (OD600), при этом полученные результаты представлены в табл. А. Кроме того использовали описанный ранее анализ методом ЖХВР (смотри выше Derrien и др., 2004; смотри выше Luzovas и др., 2014) для определения концентрации указанных Сахаров, а также продуктов, включающих ацетат, пропионат, 1,2-пропандиол.

Таблица А. Рост *A. muciniphila* на различных субстратах

Глюкоза (мМ)	Фукоза (мМ)	GlcNac (мМ)	Трип тон (г/л)	Слизь (г/л)	Рост OD600
-	-	-	-	5	2,5
-	-	-	-	2,5	0,8
-	-	-	-	1,25	0,4
20	-	-	-	2,5	2,3
-	20	-	-	2,5	1,6
-	-	20	-	2,5	2,3
20	-	-	10	-	0,6
-	20	-	10	-	0,15
-	-	20	10	-	1,0
10	10	-	10	-	0,4
10	-	10	10	-	1,0

Соединения, добавленные в базальную среду, приведены с указанием их концентраций (единицы измерения указаны в скобках), как в случае OD600, которую определяли через 24-60 часов инкубации. Данные получены в результате повторных экспериментов, при этом величина их отклонения в различных экспериментах достигала около 25%. Расшифровка сокращений приведена в тексте. Различные серии экспериментов для ясности представлены с разбивкой.

Полученные результаты подтверждают более ранние наблюдения (смотри выше Derrien и др., 2004), согласно которым слизь в концентрации 5 г/л поддерживает хороший рост *A. muciniphila* с относительно высокой скоростью (время жизни поколения приблизительно 2 часа) и высокой конечной OD600, составляющей 2,5, что соответствует примерно $5 \cdot 10^9$ клеток/мл. Тем не менее, снижение концентрации слизи резко сказывается на росте *A. muciniphila*. Были испытаны сочетания глюкозы и других Сахаров, чтобы исследовать рост *A. muciniphila*. Оказалось, что глюкоза или N-ацетилглюкозамин, но в меньшей степени фукоза, способны компенсировать двукратное снижение концентрации слизи и поддерживать рост *A. muciniphila* до OD600 более 2,0. Кроме того, отдельные сахара, в особенности, N-ацетилглюкозамин и в меньшей степени глюкоза, но не фукоза могли поддерживать рост of *A. muciniphila* в присутствии дополнительного источника азота, в данном случае триптона, являющегося продуктом триптического расщепления казеина. Сходные результаты были получены при использовании казитонона, являющегося продуктом разложения казеина ферментами поджелудочной железы. Тем не менее, рост был несколько раз меньшим по сравнению с ростом в базальной среде, содержащей 0,5% слизи, как и было описано ранее (смотри выше Derrien и др., 2004).

На основании приведенных результатов можно заключить, что N-ацетилглюкозамин является наилучшим сахаром для поддержания роста *A. muciniphila*; однако ввиду нехватки и высокой стоимости этого сахара, было бы выгоднее использовать глюкозу. Было неожиданно обнаружено, что при использовании сочетания глюкозы с N-ацетилглюкозамином рост *A. muciniphila* был значительно лучшим, чем в случае использования только глюкозы (Табл. А).

Пример 2. Треонин стимулирует рост *A. muciniphila*.

Помимо того, что N-ацетилглюкозамин мог бы использоваться с целью повышения конечной оптической плотности при выращивании *A. muciniphila* на глюкозе, было обнаружено, что для поддержания хорошего роста важен внешний источник белка. Оказалось, что при повышении концентраций триптона рост *A. muciniphila* значительно стимулировался до уровня, превышавшего уровень роста, который мог быть получен в содержащих слизь средах (табл. Б). Применимое количество триптона составляло 32 г/л, что сходно с концентрацией белка в нормальном коровьем молоке.

Эксперимент проводился в основном, как описано в примере 1.

Кроме того, был испытан эффект повышения концентрации треонина в базальной среде, содержащей глюкозу и N-ацетилглюкозамин. При концентрации треонина выше 2 мМ, предпочтительно выше 4 мМ наблюдался неожиданный эффект, обеспечивавший очень высокую OD600 *A. muciniphila* более 7,0, приближенную к показателям в промышленном масштабе.

Интересно, что может использоваться как L-треонин, так и D,L-треонин. Поскольку D,L-треонин является более доступным и менее дорогим, в среду согласно изобретению предпочтительно добавляют D,L-треонин.

Таблица Б. Рост *A. muciniphila* на различных субстратах, необязательно содержащих треонин

Глюкоза (мМ)	GlcNac (мМ)	Треонин (мМ)	Триптон (г/л)	Рост OD600
12,5	12,5	0	8	0,2
12,5	12,5	0	16	0,5
12,5	12,5	0	32	3,5
25	25	0	32	4,0
25	25	1	32	5,6
25	25	2	32	7,1
25	25	4	32	7,2

Пример 3. Рост *A. muciniphila* в средах неживотного происхождения и синтетических средах.

Поскольку казеин является источником белка животного происхождения, было проверено, можно ли использовать источники белков растительного или микробного происхождения для поддержания роста *A. muciniphila*. Поскольку соя является один из наиболее распространенных и полных источников белка, был испытан ряд промышленных препаратов гидролизованной сои. Хороший рост *A. muciniphila* наблюдался в базальных средах, содержащих глюкозу и N-ацетилглюкозамин с добавлением препаратов HySoy и AmiSoy, в обоих случаях полученных от компании Quest International, которые, как обнаружено ранее, поддерживают рост патогенных бактерий (смотри патент US 6558926 и WO 1998054296). Тем не менее, во всех случаях добавление треонина поддерживало рост, как показано в табл. В. Высокоэффективный рост *A. muciniphila* наблюдался при концентрации треонина 2 мМ и даже еще лучший рост при концентрации 4 мМ в присутствии 16 г/л HySoy.

Изменение соотношения глюкозы и N-ацетилглюкозамина в присутствии HySoy и треонина сказывалось на росте *A. muciniphila* и продемонстрировало, что оба сахара также необходимы при использовании этих сред на соевой основе, но их соотношение может отличаться (табл. В). Это также наблюдалось при использовании выделенного из казеина триптона, и говорит том, что оптимизация соотношения глюкозы и N-ацетилглюкозамин может осуществляться независимо от источника азота.

Чтобы проверить, может ли источник белка микробного происхождения также поддерживать рост *A. muciniphila*, добавили дрожжевой экстракт (Difco). Поскольку дрожжевые экстракты обычно являются более дорогостоящими, чем среды на соевой основе (Kwon и др., *Enzyme Microb Technol.* 2000 Feb 1;26(2-4):209-215), добавили в среду, которая поддерживала рост *A. muciniphila* до OD600 4,4, относительно небольшое количество дрожжевого экстракта, и обнаружили, что он еще больше усилил рост *A. muciniphila* до OD600 6,5 (табл. С). Это говорит о том, что дрожжевой экстракт может использоваться для поддержания роста, а также что увеличение количества источника белка может дополнительно увеличивать рост *A. muciniphila* в средах неживотного происхождения.

Поскольку очевидно, что наиболее экономически эффективным является выращивание бактерий в синтетической среде, было проверено, какие аминокислоты в гидролизате сое способны поддерживать рост. Было обнаружено, что смесь 4 аминокислот, включающих аланин, глутамат, пролин и серии (по 4 мМ каждой) может поддерживать рост *A. muciniphila* без потребности в других аминокислотах помимо треонина в присутствии глюкозы и N-ацетилглюкозамина (табл. В). Поскольку наблюдавшийся рост превышал рост только на слизи (смотри выше), это открывает возможности дальнейшей оптимизации экономически эффективного выращивания *A. muciniphila*. По существу, серии также может быть заменен треонином, и было обнаружено, что сочетание только треонина и пролина служит высокоэффективным источником азота для *A. muciniphila*.

Таблица В. Рост *A. muciniphila* на различных субстратах, HySoy, дрожжевом экстракте (YE) в концентрации 10 г/л и 4 аминокислотах (AA), включающих аланин, глутамат, пролин и серии (по 4 мМ каждой). Эксперименты проводились в основном, как описано в примере 5.

Глюкоза (мМ)	GlcNac (мМ)	Треонин (мМ)	HySoy (г/л)	Добавки	Рост OD600
25	25	0	16	-	0,2
25	25	2	16	-	1,8
25	25	4	16	-	4,4
50	0	2	16	-	0,1
0	50	2	16	-	3,9
40	10	2	16	-	0,3
10	40	2	16	-	2,8
25	25	4	16	YE (10 г/л)	6,5
25	25	4	-	AA (4 мМ)	2,9

Пример 4. Ферментация *A. muciniphila* в промышленном масштабе.

Чтобы проиллюстрировать возможность получения *A. muciniphila* в промышленном масштабе, выращивали *A. muciniphila* в описанной выше базальной среде, содержащей 32 г HySoy, 25 г глюкозы, 4,4 г

N-ацетилглюкозамина, 4 г треонина, 0,5 г цистеина на 1 кг среды, а также витаминный раствор (смотри выше Dement и др., 2004), в 600-литровом ферментере при pH 7,0. После ферментации OD600 культуры составляла 7,2, что говорит о том, что среда, содержащая глюкозу, N-ацетил-глюкозамин и источник белка неживотного происхождения, способна поддерживать отличный рост *A. muciniphila* в промышленном масштабе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ культивирования бактерий *Akkermansia muciniphila*, отличающийся тем, что для культивирования используют базальную среду с добавлением композиции, содержащей глюкозу, N-ацетил-глюкозамин, а также треонин и/или источник аминокислот животного происхождения, или треонин и источники аминокислот растительного и микробного происхождения, или треонин и источник аминокислот растительного происхождения или смесь аминокислот, полученная из источника растительного происхождения,

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что композиция содержит глюкозу в количестве 10-25 mM.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что композиция содержит N-ацетил-глюкозамин в количестве 25-40 mM.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что композиция содержит треонин в количестве 2-4 mM.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что источник аминокислот растительного происхождения представляет собой гидролизат соевого белка.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что композиция содержит гидролизат соевого белка в количестве 16 г/л.

7. Способ по п.5, отличающийся тем, что смесь аминокислот, полученная из указанного гидролизата соевого белка, представляет собой смесь аланина, глутамата, пролина и серина.

