



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/20 (2019.08); C12P 21/00 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2018145944, 24.12.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.12.2018

Дата регистрации:
13.11.2019

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 24.12.2018

(45) Опубликовано: 13.11.2019 Бюл. № 32

Адрес для переписки:
107045, Москва, пер. Большой Головин, 2, ООО
"НПО Биосинтез"

(72) Автор(ы):

Буторова Ирина Анатольевна (RU),
Листов Евгений Леонидович (RU),
Кузнецов Николай Николаевич (RU),
Аксютин Олег Евгеньевич (RU),
Ишков Александр Гаврилович (RU),
Шайхутдинов Александр Зайнетдинович
(RU),
Пыстина Наталья Борисовна (RU),
Бондаренко Константин Николаевич (RU),
Чернушкин Дмитрий Викторович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ
ОБЪЕДИНЕНИЕ БИОСИТНЕЗ" (RU)**

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2613365 C1, 16.03.2017. RU
2064016 C1, 20.07.1996. GB 1463295, 02.02.1977.
CN 104774792, 15.07.2015. US 3930947, 06.01.1976.

(54) **Штамм бактерий *Methylococcus capsulatus* КОНЦЕПТ-8 - продуцент белковой биомассы**

(57) Реферат:

Изобретение относится к микробиологической промышленности и может быть использовано для получения белковой биомассы. Предлагается штамм бактерий *Methylococcus capsulatus*, депонированный во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН под регистрационным номером ВКМ В-3289Д.

Штамм продуцирует белковую биомассу с содержанием белка свыше 79%, обладает метанокисляющими свойствами, резистентностью к внешним воздействиям в широких пределах параметров культивирования, высокой скоростью роста в оптимальных условиях. 1 табл., 5 пр.

RU 2 706 074 C1

RU 2 706 074 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 706 074**⁽¹³⁾ **C1**

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

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12N 1/20 (2019.08); C12P 21/00 (2019.08)

(21)(22) Application: **2018145944, 24.12.2018**(24) Effective date for property rights:
24.12.2018Registration date:
13.11.2019

Priority:

(22) Date of filing: **24.12.2018**(45) Date of publication: **13.11.2019 Bull. № 32**Mail address:
**107045, Moskva, per. Bolshoj Golovin, 2, OOO
"NPO Biosintez"**

(72) Inventor(s):

**Butorova Irina Anatolevna (RU),
Listov Evgenij Leonidovich (RU),
Kuznetsov Nikolaj Nikolaevich (RU),
Aksyutin Oleg Evgenevich (RU),
Ishkov Aleksandr Gavrilovich (RU),
Shajkhutdinov Aleksandr Zajnetdinovich (RU),
Pystina Natalya Borisovna (RU),
Bondarenko Konstantin Nikolaevich (RU),
Chernushkin Dmitrij Viktorovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**OBSHCHESTVO S OGRANICHENNOJ
OTVETSTVENNOSTYU
NAUCHNO-PROIZVODSTVENNOE
OBEDINENIE BIOSITNEZ (RU)**

(54) METHYLOCOCCUS CAPSULATUS CONCEPT-8 BACTERIA STRAIN - PRODUCER OF PROTEIN BIOMASS

(57) Abstract:

FIELD: microbiology.

SUBSTANCE: invention relates to microbiological industry and can be used for production of protein biomass. Disclosed is a strain of bacteria *Methylococcus capsulatus*, deposited in the All-Russian Collection of Microorganisms IBPM them. G.K. Skryabin RAS under registration number VKM V-3289D.

EFFECT: strain produces a protein biomass with protein content higher than 79 %, has methane-oxidizing properties, resistance to external effects in a wide range of cultivation parameters, high growth rate under optimal conditions.

1 cl, 1 tbl, 5 ex

C 1
2 7 0 6 0 7 4
R U

R U
2 7 0 6 0 7 4
C 1

Изобретение относится к микробиологической промышленности и может быть использовано для биосинтеза высокобелкового премикса к кормам сельскохозяйственных, домашних и содержащихся в неволе животных. Заявленный штамм бактерий *Methylococcus capsulatus* CONCEPT-8, обладающий метанооксиляющими свойствами, резистентностью к внешним воздействиям в широких пределах параметров культивирования, высокой скоростью роста в оптимальных условиях, депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером ВКМ В-3289Д

Метанооксиляющие бактерии, использующие метан и его производные в качестве источника углерода и энергии, находят применение для снижения концентрации метана в угольных шахтных газах, в биосинтезе богатой белком биомассы, нашедшей применение в качестве премикса к животным кормам.

Метанооксиляющие бактерии, использующие метан и его производные в качестве источника углерода и энергии, широко распространены в природе, являясь биофильтром, снижающим вероятность попадания метана в тропосферу планеты и нарушения озонового слоя.

Особый интерес представляет собой использование бактерий *Methylococcus capsulatus*, как биосинтетической системы, активно перерабатывающей содержащийся в природном, в том числе, шахтном газе метан, и быстро наращивающей свою биомассу, отличающуюся высоким содержанием ценного белка, а также биологически активных веществ, в том числе витаминов. Биомасса *Methylococcus capsulatus* характеризуется высоким уровнем сырого протеина (не менее 70%), а также похожим на рыбную муку соотношением аминокислот, что позволяет использовать ее как белковый премикс к кормам.

Испытания кормов с включением биомассы метанооксиляющих бактерий, проведенные на сельскохозяйственных животных, птицах и рыбе подтвердили высокую биологическую ценность этой биомассы как источника протеина, витаминов и других питательных веществ. Давно доказана безвредность применения биомассы метанооксиляющих бактерий (1-5). Ветеринарными и санитарно-гигиеническими исследованиями установлена доброкачественность и безвредность продуктов животноводства, птицеводства и рыбоводства, полученных при использовании кормов с биомассой метанооксиляющих бактерий. (6-8).

Несмотря на то, что по ряду показателей бактериальная биомасса отличается от традиционных белковых премиксов, в частности, высоким содержанием нуклеиновых кислот, отсутствием полиненасыщенных жирных кислот и наличием жирных кислот (9), применение биомассы метанооксиляющих бактерий не оказывают отрицательного влияния на рост и развитие животных, в частности мальков и товарной рыбы. (10, 11).

Различные виды микроорганизмов являются продуцентами полноценного белка и витаминов. Многие из них нашли применение в кормопроизводстве благодаря разработанным и испытанным технологиям (12).

В ряде технологий, в качестве продуцентов белка используются высоко продуктивные грибы рода *Candida*. (13-16). (Патент РФ №2042713, №2090610, Авт.Св. СССР №№3221059, 1817471). В других успешно используются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (Авт. св. СССР №1575570; Патент РФ №2650689), отличающиеся, однако, невысокой продуктивностью и способные развиваться только при низкой концентрации субстрата в среде, что снижает экономическую эффективность их применения (17-18).

Известны штаммы молочнокислых и пропионовых бактерий, используемые в качестве продуцентов белка (патенты РФ №2244000; 2390554; №2244001; №2250258 и ряд других). (19- 22). Общим недостатком данных штаммов является недостаточно

высокая концентрация биомассы, биосинтез которой подавляется образующейся молочной или пропионовой кислотами.

Известны шляпочные грибы *Flammulina velutipes* НБК F-112 (А.С. №727687) и *Pleurotus ostreatus* Kummer (А.С. №427993) продуценты белка, биомасса которого может
5 быть использована как полноценный белковый премикс (23-24). Однако использование для их выращивания сложных сред с высоким содержанием глюкозы и отходов пищевой промышленности, непосредственно используемых в качестве добавок в корм

сельскохозяйственных животных, делает их использование практически бессмысленным. Известен штамм ацидофильных метилотрофных бактерий *Acetobacter methylicum*
10 ВСБ-867 - продуцент белково-витаминной биомассы (А.С. №925112), характеризующийся, однако, недостаточно высокой продуктивностью и нестабильным выходом конечного продукта (25)

Известны штаммы метанотрофных бактерий, культивируемых на природном газе и активно размножаясь, наращивая свою биомассу, продуцирующих белок, обогащенный
15 биологически активными соединениями и пригодный для использования в качестве премикса к кормам (26-32). (Патент РФ №№2613365, 206416; Авт.св. СССР №№770200, 908085, 501681, 1072815, 615871).

Наиболее активным продуцентом белковой биомассы на природном газе является вид *Methylococcus capsulatus*. К недостаткам данного вида метанотрофа можно отнести
20 нестабильность его роста на природном газе при длительном культивировании в условиях проточного режима, что снижает продуктивность процесса и выход готового продукта.

Наиболее близким к заявленному изобретению является штамм метаноокисляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15, описанный в патенте РФ №2613365 (33).
25 Полученный штамм *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 обладает рядом свойств, обеспечивающих ему более стабильный рост в процессе культивирования. Авторами патента показана фагоустойчивость штамма при выращивании его в атмосфере природного газа разного состава (с содержанием метана от 85% об. до 99,9% об.) и на
30 различной воде, которые являются потенциальными источниками поступления в систему внешних фагов, а также могут спровоцировать активность профагов самой культуры. Авторами была показана также устойчивость штамма *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 к гомологам метана, поступающим в среду культивирования вместе с метаном в составе природного газа, в частности этану (2-4%), пропану (1,5-3%) и бутану (0,1-0,8%). В патенте также отмечается рост штамма *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 в условиях
35 повышенного давления до 6 атм. При этом достигается концентрация биомассы 32 г/л и скорость протока 0,25 час⁻¹.

Однако следует отметить, что в примере №1 авторами не указывается продолжительность процесса культивирования, что затрудняет оценку фагоустойчивости
40 штамма. Кроме того, в зависимости от месторождения природного газа (особенно газоконденсатных месторождений) в его составе содержится более высокие количества гомологов метана, а также обнаруживается пентан. В попутных газах в небольших количествах могут встречаться высшие углеводороды. В шахтных газах помимо прочего содержится СО₂, концентрация которого составляет 3-6%. Следует отметить, что в
45 процессе культивирования метаноокисляющих микроорганизмов в среде могут накапливаться продукты неполного окисления метана (метанол, формальдегид, формиат), органические кислоты, углеводы и др., которые также могут оказывать ингибирующее действие на рост бактерий.

Задачей, на решение которой направлено предлагаемое изобретение, является

получение нового штамма метанооксиляющих бактерий с более широким потенциалом устойчивости, сохраняющего стабильный рост и высокую продуктивность в процессе длительного культивирования на природном газе.

5 Техническим результатом, на достижение которого направлено предлагаемое изобретение, является повышение продуктивности штамма метанооксиляющих микроорганизмов *Methylococcus capsulatus*, достижение стабильного выхода конечного продукта, а также обеспечение резистентности к вариациям внешних условий, в том числе:

10 - механорезистентности, что позволяет интенсифицировать потоки в культуральной среде, снизить диффузионные ограничения и увеличить концентрацию метана активизировать аэрацию;

- барорезистентности, что позволяет, при необходимости, регулировать растворимость газов в культуральной жидкости и увеличивать выход биомассы, варьируя давление;

15 - резистентности к повышенным концентрациям гомологов метана содержащихся в природном газе, в том числе, шахтном газе, что позволяет снизить его концентрацию в шахтном газе, а также использовать сырье для биосинтеза белка метанооксиляющими микроорганизмами *Methylococcus capsulatus* из различных источников и уменьшить вариабельность выхода конечного продукта;

20 - повышенной резистентности к ингибирующему эффекту продуктов метаболизма в возвращаемой в процесс культивирования отработанной культуральной жидкости, что позволяет снизить потери составляющих минерального питания и, соответственно, увеличить эффективность процесса.

Для достижения указанного технического результата штамм *Methylococcus capsulatus* 25 CONCEPT-8 был получен из коллекционного штамма *Methylococcus capsulatus* ВКМ В - 2116. Предварительную адаптацию штамма к потенциальным ингибиторам проводили в условиях качалочных колб при последовательном многократном пассивировании штамма в заданных условиях. Дальнейший отбор штамма вели путем последовательной многоступенчатой селекции в условиях проточного культивирования штамма на 30 природном газе в условиях незащищенной ферментации в присутствии выбранных потенциальных ингибиторов при постепенном увеличении скорости протока от 0,05 час-1 до 0,35 час-1. Критериями отбора служили технологические параметры: скорость роста и содержание белка в биомассе.

В результате проведенной селекции, выделен штамм метанооксиляющих бактерий 35 *Methylococcus capsulatus* (CONCEPT-8) ВКМ В -3289Д, который может найти применение в технологиях получения биомассы с высоким содержанием белка, при культивировании на метане,

содержащимся как в природном газе, так и в шахтном газе.

40 Штамм *Methylococcus capsulatus* ВКМ В -3289Д хранят на жидкой минеральной среде при температуре 4°C, пересев 1 раз в 3 месяца на минеральной среде в атмосфере метана.

Культурально-морфологические признаки штамма.

Клетки штамма имеют форму кокка и диплококка, диаметром 0,8-1,0 мкм, неподвижные. На агаризованной среде образует мелкие прозрачные колонии (d - 1 мм на 2-ые сутки культивирования), выпуклые, блестящие, гладкие с ровным краем. Штамм 45 сохраняет жизнеспособность в широком диапазоне температур (20-60°C) и рН (4,5-8,0). Оптимальные значения температуры 40-42°C и рН 6,6-6,7. Штамм является облигатным метанотрофом, использует метан в качестве единственного источника углерода и энергии. Не нуждается в факторах роста. Устойчив к примесям гомологов метана и

CO₂, содержащихся в природном газе. Штамм способен образовывать покоящиеся формы типа незрелых цист *Azotobacter*.

Штамм непатогенен.

Генетические манипуляции со штаммом не производились. Полученный в результате селекционных работ штамм *Methylococcus capsulatus* ВКМ В -3289Д характеризуется:

- механорезистентностью, в результате чего число целых, способных к нормальной жизнедеятельности клеток, практически не уменьшается в поле акустических микропотоков с высокими градиентами скоростей, что позволяет интенсифицировать перемешивание в культуральной среде, снизить диффузионные ограничения, ускорить процесс растворения и увеличить концентрацию растворенных в культуральной среде газов;

- барорезистентностью, что позволяет увеличить концентрацию растворенных в культуральной среде газов;

- резистентностью к повышенным концентрациям гомологов метана содержащихся в природном газе, в том числе, шахтном газе, что позволяет снизить его концентрацию в шахтном газе, а также использовать сырье для биосинтеза белка метанооксилирующими микроорганизмами *Methylococcus capsulatus* ВКМ В -3289Д из различных источников и уменьшить вариабельность выхода конечного продукта;

- повышенной резистентностью к ингибирующему эффекту продуктов метаболизма в возвращаемой в процесс культивирования отработанной культуральной жидкости, что позволяет снизить потери составляющих минерального питания и, соответственно, увеличить эффективность процесса.

Конечный продукт, получаемый при культивировании штамма *Methylococcus capsulatus* ВКМ В -3289Д - микробная биомасса с

высоким содержанием белка.

Область применения штамма - промышленный биосинтез биомассы с высоким содержанием белка.

Изобретение поясняется примерами, не носящими, однако, ограничительного характера.

Пример 1. Штамм *Methylococcus capsulatus* (CONCEPT-8) ВКМ В -3289Д выращивали на ферментере с рабочим объемом 1,7 л на минеральной среде следующего состава г/л: KNO₃ - 1,0; MgSO₄·7H₂O - 0,2; CaCl₂ - 0,02;

Na₂HPO₄·12H₂O - 1,5; KH₂PO₄ - 0,7;

FeSO₄·7H₂O - 2,0 мг; ZnSO₄·7H₂O - 0,1 мг;

MnCl₂·4H₂O - 0,03 мг; CuCl₂·5H₂O - 0,1 мг; CoCl₂·6H₂O - 0,2 мг; NiCl₂·6H₂O - 0,02 мг; Na₂MoO₄ - 0,03 мг; H₃BO₃ - 0,03 мг; ЭДТА-Na₂ - 5,0.

рН среды 6,7

Процесс вели при давлении 0,2 МПа, газовая фаза содержала смесь метан:воздух в соотношении 1:3.

Метан -99,9%

Температура культивирования 42°C

Продолжительность процесса - 336 часов

Скорость протока $D=0,28 \text{ час}^{-1}$

Концентрация биомассы составила 11,8-12,3 г/л, содержание сырого протеина в биомассе - 79,4%

Пример 2.

Культивирование вели как описано в примере 1.

Газовая смесь содержала метан: этан в %-ом соотношении 94: 6. Скорость протока $D=0,28$ час⁻¹

Концентрация биомассы составила 11,7-12,0 г/л, содержание сырого протеина 78,1%

Пример 3.

5 Культивирование вели как описано в примере 1.

Газовая смесь содержала метан: этан: пентан в %-ом соотношении 92: 6:2. Скорость протока $D=0,28$ час⁻¹

Концентрация биомассы составила 11, 5-11, 7. г/л, содержание сырого протеина 78%

Пример 4.

10 Культивирование вели как описано в примере 1. Процесс вели при давлении 0,2 МПа, газовая фаза содержала смесь метан: воздух в соотношении 1:3.

Метан - 99,9%

В среду культивирования добавляли отработанную культуральную жидкость (ОКЖ), полученную после отделения клеток метанотрофа.

15 ОКЖ содержит весь комплекс продуктов метаболизма метанотрофа, которые образуются в процессе выращивания метанотрофа на природном газе

, включая метанол, формальдегид, формиат, полисахариды, органические кислоты и др. (33-38).

20 Суммарной количественной характеристикой всех органических веществ, образующихся в процессе культивирования являются показатели ХПК(мгО₂/л) и БПК (мгО₂/л).

В среду культивирования добавляли ОКЖ со следующими показателями:

ХПК = 1650 мгО₂/л

25 БПК = 1100 мгО₂/л

ОКЖ в среду культивирования добавляли в количестве 1-10 об.%.

Содержание ОКЖ в среде, %	Скорость протока, час ⁻¹	Концентрация биомассы, г/л	Содержание сырого протеина в биомассе, %
1	0,28	11,8-12,3	79,4
5	0,28	11,5-12,0	79,4
10	0,28	11,4-11,8	79,2

Пример 5

35 Культивировании штамма *Methylococcus capsulatus* (CONCEPT-8) ВКМ В -3289Д вели на ферментере с рабочим объемом 1,7 л на минеральной среде как и в примере 1.

pH среды 6,7

Процесс вели при давлении 0,1 МПа, газовая фаза на входе в ферментер содержала смесь: метан -6%, кислород - 19%, углекислый газ - 1,5%, остальное - азот.

Метан -99,9%

40 Температура культивирования 42°C

Продолжительность процесса - 336 часов

Скорость протока $D=0,25$ час⁻¹

Концентрация биомассы составила 0,7-0,8 г/л, содержание сырого протеина в биомассе - 78,0%.

45 Газовая фаза на выходе из ферментера содержала смесь: метан -3,7%, кислород - 17%, углекислый газ - 4,3%, остальное - азот.

Представленные примеры характеризуют штамм *Methylococcus capsulatus* ВКМ В -3289Д, как продуцент высокого содержания белка в микробной биомассе, способный

обеспечивать высокие его показатели в широком диапазоне концентрации метана (от 6 до 99,9%) при его культивировании и повышенной резистентности к ингибирующему эффекту продуктов метаболизма.

5

(57) Формула изобретения

Штамм метаноокисляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ВКМ В-3289Д для биосинтеза белковой биомассы.

10

15

20

25

30

35

40

45