

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291369** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.12.26

(22) Дата подачи заявки
2022.06.01

(51) Int. Cl. *A23J 1/00* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/06 (2006.01)
C12N 1/08 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12R 1/26 (2006.01)
C12R 1/265 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВОГО ПРОДУКТА ИЗ БИОМАССЫ
МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ И БЕЛКОВЫЙ ПРОДУКТ, ПОЛУЧЕННЫЙ
УКАЗАННЫМ СПОСОБОМ**

(96) **2022000043 (RU) 2022.06.01**
(71) Заявитель:
ООО "ГИПРОБИОСИНТЕЗ" (RU)

(72) Изобретатель:
**Бабусенко Елена Сергеевна,
Колесникова Юлия Николаевна,
Куликова Наталья Леонидовна,
Лалова Маргарита Витальевна,
Левитин Леонид Евгеньевич,
Нюньков Павел Андреевич, Цымбал
Владимир Владимирович (RU)**

(74) Представитель:
Вахнин А.М. (RU)

(57) Группа изобретений относится к пищевой и микробиологической промышленности и касается получения белкового продукта на основе биомассы метанооксиляющих бактерий, который впоследствии может быть использован в качестве ингредиента при производстве функциональных пищевых продуктов. Способ получения белкового продукта из биомассы метанооксиляющих бактерий включает выращивание биомассы метанооксиляющих бактерий, концентрирование, разрушение клеточной стенки путем обработки ультразвуком с частотой 20-22 кГц и акустической мощностью 100-150 Вт в течение 10-20 мин при температуре 2-8°C, щелочной гидролиз при pH 8,5-9,3, температуре 85-95°C в течение в течение 60-120 мин, удаление нуклеиновых кислот, кислотный гидролиз при pH 1,9-2,2, температуре 85-95°C в течение 4-8 ч, выделение белка, сушку. Изобретение позволяет получить продукт с высоким выходом и чистотой, а также обладающий требуемыми функциональными свойствами, в частности высокой растворимостью в воде и пенообразующей способностью, при этом со сбалансированным содержанием аминокислот для возможности дальнейшего применения в пищевой промышленности.

A1

202291369

202291369

A1

A23J 1/18

A23J 3/20

C12N 1/06

C12N 1/08

C12N 1/20

Способ получения белкового продукта из биомассы метаноксиляющих бактерий и белковый продукт, полученный указанным способом

Группа изобретений относится к пищевой и микробиологической промышленности и касается получения белкового продукта на основе биомассы метаноксиляющих бактерий, который впоследствии может быть использован в качестве ингредиента при производстве функциональных пищевых продуктов.

Бактерии значительно быстрее, чем дрожжевые клетки, наращивают биомассу и, кроме того, белки бактерий содержат больше цистеина и метионина, что позволяет отнести их в разряд белков с высокой биологической ценностью. Источником углерода при культивировании бактерий могут служить природный и попутный газы, водород, а также спирты – метанол, этанол, пропанол. К наиболее перспективным продуцентам бактериального белка относят метаноксиляющие бактерии. Основным признаком этого семейства является способность организмов использовать метан в качестве единственного источника углерода и энергии в аэробных или микроаэрофильных условиях. Содержание белка, выделенного из клеток чистых культур метанотрофных бактерий, может достигать 70-80% от сухой биомассы, при этом незаменимых аминокислот столько же или больше, чем в рыбной и соевой муке.

Особенностью бактериальной биомассы является большое количество нуклеиновых кислот (НК), связанное с высокой скоростью белкового синтеза бактерий в процессе их роста. По уровню нуклеиновых кислот биомасса на основе природного газа отличается от традиционных кормовых компонентов.

В рыбной муке содержание НК не превышает 2%, в мясокостной – 1%, в растительных кормах – ниже 0,5%. В дрожжах количество НК составляет 8-10% сухого вещества, в биомассе на основе метаноксиляющих бактерий до 12-14%. В связи с этим, для применения в пищевых целях в качестве белковой добавки, количество нуклеиновых кислот в биомассе необходимо снизить до количеств, соответствующих продуктам животного или растительного происхождения.

Основным изученным процессом по выделению белка из микроорганизмов является гидролиз, который может быть кислым, щелочным, ферментативным.

Режим проведения процесса гидролиза обычно задается концентрацией кислоты, щелочи, фермента, концентрацией сырья, степенью отмывки (гидромодулем),

температурой гидролиза и его продолжительностью. Варьируя эти параметры, можно получать гидролизаты прогнозируемого состава.

Из уровня техники GB 1 513 836 A, 14.06.1978 известен способ получения белка одноклеточных микроорганизмов, в котором проводят водную экстракцию биомассы микроорганизмов при повышенной температуре в щелочных условиях для удаления преимущественно нуклеиновых компонентов, затем проводят разделение экстракта и клеточного концентрата, щелочную экстракцию белковых компонентов из клеточного концентрата при pH 8,5-10,0 и температуре от 70 до 90°C, разделяют экстракт и клеточные остатки с пониженным содержанием нуклеиновых кислот, затем pH клеточного экстракта доводят до нейтрального значения.

Недостатком известного способа является низкий выход продукта, так как водный экстракт, получаемый на первой стадии, содержит повышенное количество пуриновых компонентов и не может использоваться ни в пищевой, ни в медицинской промышленности. С другой стороны, пищевой белковый экстракт, получаемый щелочной экстракцией имеет низкую пищевую ценность.

Также из уровня техники RU 2091491 C1, 27.09.1997 известен способ получения нуклеиновых кислот из бактерий, отличающийся тем, что биомассу клеток метанутилизирующих бактерий *Methylococcus capsulatus* подвергают экстракции водно-щелочным или водно-солевым раствором, причем сначала выделяют РНК при pH 7,0 7,5 и температуре 85 90° C, а затем при pH 8,6 9,0 и той же температуре выделяют смесь ДНК и РНК с последующим их разделением. Указанный способ не позволяет получить белковый препарат с высоким выходом, а только лишь выделить нуклеиновые кислоты.

Также в уровне техники CA 3047355 A1, 28.06.2018 описан способ удаления нуклеиновых кислот из биомассы, например для производства одноклеточного белка из культивируемых метанотрофных бактерий с пониженным содержанием нуклеиновых кислот, включающий: (i) обеспечение материала биомассы; (ii) подвергание материала биомассы процессу разрушения клеток с получением разрушенного материала биомассы; (iii) применение разрушенного материала биомассы в первом процессе разделения, приводящем к получению первой фракции (первого ретентата), содержащей белки, и второй фракции (первого пермеата), содержащей нуклеиновые кислоты; (iv) подвергание второй фракции (первый пермеат) второй обработке, приводящей к третьей фракции (второй ретентат), содержащей нуклеиновую кислоту, и четвертой фракции второго пермеата), содержащей витамины, минералы и / или аминокислоты. Способ позволяет выделить различные фракции из биомассы метанотрофных микроорганизмов, однако они не обладают достаточной степенью чистоты и контролируемым содержанием аминокислот, позволяющим применять их в качестве ингредиента в пищевой промышленности.

Совместное применение щелочного и кислотного гидролиза для получения белковых препаратов из микробной биомассы метанооксиляющих микроорганизмов также известно из уровня техники.

Например, в US 4007088 A1, 08.02.1977 раскрыт способ получения нативного микробного белка из одноклеточных микробных клеток (в том числе, бактерий рода *Methanomonas*) с содержанием нуклеиновых кислот ниже 1%, который можно использовать в качестве пищи или корма, который включает стадии: а. разрушение микробных клеток для высвобождения содержащейся в них нуклеазы и последующее образование гомогената, содержащего разрушенные клетки и нуклеазу; б. доведение значения рН указанного гомогената до 5,9-8,0 и поддержание температуры при 50-60 °С в течение 20 минут-2,5 часов, чтобы обеспечить разложение нуклеиновых кислот с помощью нуклеаз, содержащихся в гомогенате; с. осаждение белкового материала из микробного гомогената путем доведения значения рН до изоэлектрической точки белкового материала; d. отделение осажденного белкового материала; е. сушку осажденного белкового материала.

В автореферате (КРЫЛОВ И.А. ОСНОВЫ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ БИОМАССЫ ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, Автореферат на соискание уч.ст. д.х.м., Москва, 1998, 44 с.) описан способ выделения белка и нуклеиновых кислот из биомассы бактерий *Methylococcus capsulatus*, включающий на первом этапе обработку щелочными реагентами с целью отделения нуклеиновых кислот при рН 7,0-9,0 и температуре 70-95 °С в течение до 60 минут с дальнейшим проведением осаждения кислотными реагентами при рН, соответствующему кислой среде и температуре 70-160 °С. Этот способ позволяет получить спектр продуктов нуклеотидной и белковой природы различной степени очистки и назначения.

Наиболее близким по технической сущности изобретением является биологически активная добавка защитного действия (RU 2681791 С, 12.03.2019), характеризующаяся тем, что она представляет собой денуклеинизированную бактериальную биомассу штамма метанооксиляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15. При этом указанную добавку получают путем экстракции из биомассы нативных клеток метанооксиляющих бактерий, далее из полученного экстракта выделяют нуклеиновые кислоты - ДНК и РНК. Содержание белковых веществ в готовом продукте 60-80 масс %. При этом получают продукт с невысоким содержанием белка.

Техническим результатом заявленного изобретения является получение микробного белка с высоким выходом и чистотой, а также обладающего требуемыми функциональными свойствами, в частности, высокой растворимостью в воде и пенообразующей способностью, при этом со сбалансированным содержанием аминокислот для возможности дальнейшего применения в пищевой промышленности.

Для достижения указанного технического результата используют заявленный способ получения белкового продукта из биомассы метанооксиляющих бактерий, включающий выращивание биомассы метанооксиляющих бактерий, концентрирование, разрушение клеточной стенки, щелочной гидролиз, удаление нуклеиновых кислот, кислотный гидролиз, выделение белка, сушку, причем разрушение клеточной стенки проводят путем обработки ультразвуком с частотой 20-22 кГц и акустической мощностью

100-150 Вт в течение 10-20 минут при температуре 2-8 °С, щелочной гидролиз проводят при pH=8,5-9,3 температуре 85-95 °С в течение в течение 60-120 минут, а кислотный гидролиз при pH 1,9-2,2 температуре 85-95 °С в течение 4-8 часов.

При этом белковый продукт, полученный указанным способом, характеризуется тем, что содержание компонентов в сухом остатке составляет, масс.‰: белка – не менее 80, нуклеиновых кислот – не более 2, золы – не более 5, аминокислот – не менее 45. Указанный продукт обладает сбалансированным составом аминокислот, который позволяет применять его в качестве функционального ингредиента в пищевой промышленности.

Авторами было предложено использовать предобработку микробной биомассы метанооксиляющих бактерий с использованием ультразвука с заданными режимами с целью разрушения клеточных оболочек, что позволяет сделать клетки более доступными для проведения дальнейшего комплексного гидролиза с дальнейшим выделением белкового продукта с высоким содержанием белка и степенью чистоты.

Причинами изменений, возникающих в биологических объектах под действием ультразвука, могут быть вторичные эффекты физико-химического характера. Так, под действием акустических волн происходит энергичное перемешивание внутриклеточных микроструктур, а кавитация в среде приводит к разрыву молекулярных связей. Ультразвуковые низкочастотные поля ускоряют процессы диффузии, повышают проницаемость клеточных оболочек. В результате увеличивается выход белков. Поскольку получаемый материал содержит большое число белковых и биополимерных комплексов, возникают трудности при получении высокоочищенных препаратов. Поэтому нами были подобраны специальные режимы ультразвуковой предобработки микробной биомассы с целью получения белкового продукта высокой степени чистоты и выхода.

Обработку микробной биомассы проводили в ультразвуковом генераторе (дезинтеграторе) при низких частотах (Криамид, Россия). Однако можно использовать любой низкочастотный ультразвуковой дезинтегратор, позволяющий работать в заданных режимах.

Выделение фракции нуклеиновых кислот можно осуществлять любым из известных способов: путем осаждения в изоэлектрической точке, высаживание солями, с помощью ионообменной хроматографии.

Заявленный способ осуществляют следующим образом.

Используют биомассу на основе *Methylococcus capsulatus* или *Methylomonas methanica*.

Выращенную в ферментере биомассу метанооксиляющих бактерий концентрируют в сепараторе (центрифуге, декантаторе) до концентрации 8-15 %, а затем подают на ультразвуковую обработку с использованием низкочастотного генератора (ультразвукового дезинтегратора) для разрушения клеточной стенки. Обработку ультразвуком проводят с частотой 20-22 кГц и акустической мощностью 100-150 Вт в течение 10-20 минут при температуре 2-8 °С. Проведение ультразвуковой обработки в

«холодных» условиях позволяет максимально сохранить исходные свойства образующихся в процессе расщепления веществ.

Далее полученную суспензию, содержащую разрушенные клетки, направляют в реактор, где нагревают и проводят первую стадию щелочного гидролиза.

В реакторе суспензию нагревают до температуры 75-80 °С, затем 2 н раствором NaOH (можно аммиачной водой) доводят рН до 8,5-9,3, догревают до 85-95°С и проводят щелочной гидролиз в течение 60-120 минут. В течение всего времени поддерживают рН процесса на уровне 8,5-9,3 и температуру 85-95°С. Для поддержания рН проводят автоматическую подтитровку перемешиваемой суспензии, температуру поддерживают с помощью термостата. При этом извлекается основная масса нуклеиновых кислот с примесью белка. По окончании времени гидролиза, полученную суспензию направляют на сепарацию или микрофильтрацию для отделения биомассы. Полученную биомассу дважды промывают водой для удаления выделенных нуклеиновых компонентов. Из полученного супернатанта выделяют нуклеиновые кислоты любым из известных способов: путем осаждения в изоэлектрической точке, высаживание солями, с помощью ионообменной хроматографии. После первой стадии щелочного гидролиза получают денуклеинизированную биомассу. Денуклеинизированная биомасса содержит не более 2% нуклеиновых кислот и сама может быть целевым продуктом - может использоваться в качестве пищевого ингредиента (например, в мясоперерабатывающей, хлебопекарной промышленности и др.). Однако ее далее направляют на вторую стадию кислотного гидролиза.

Вторую стадию гидролиза - кислотного гидролиза осуществляют в реакторе, где суспензию нагревают до 70-75 °С при постоянном перемешивании. Затем 15%-ным раствором HCl доводят рН до 1,9-2,2, доводят температуру суспензии до 85-95°С и проводят кислотный гидролиз в течение 4-8 часов. В течение всего процесса гидролиза поддерживают температуру в реакторе 85-95°С и рН 1,9-2,2. По окончании времени гидролиза полученную суспензию подвергают микрофильтрации.

На стадии микрофильтрации экстрагированные белковые компоненты отделяют от биомассы: для этого биомассу дважды или трижды промывают водой до заданной концентрации белка в полученном фильтрате. Полученный фильтрат, содержащий экстракт белковых веществ возможно подвергать дополнительной обработке или без обработки направлять на высушивание (например, распылительную или лиофильную сушку). После проведения процесса высушивания получают сухой белковый продукт из биомассы метанооксиляющих бактерий.

Заявленное изобретение далее иллюстрируется на конкретных примерах выполнения.

Пример 1.

Выращенную в ферментере биомассу метанооксиляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 концентрируют в сепараторе до концентрации 12-13 % АСВ, а затем подают на ультразвуковую обработку с использованием ультразвукового дезинтегратора и

проводят обработку ультразвуком с частотой 22 кГц и акустической мощностью 100 Вт в течение 15 минут при температуре 3 °С. Далее полученную суспензию, содержащую разрушенные клетки, направляют в реактор, где нагревают и проводят первую стадию щелочного гидролиза, а именно, нагревают до температуры 78 °С, затем 2н раствором NaOH доводят рН до 8,7-8,8, догревают до 87 °С и проводят щелочной гидролиз в течение 70 минут. В течение всего времени поддерживают рН процесса на уровне 8,7-8,8 и температуру 87 °С. Для поддержания рН проводят автоматическую подтитровку перемешиваемой суспензии, температуру поддерживают с помощью термостата. По окончании времени гидролиза, полученную суспензию направляют на сепарацию или микрофилтрацию для отделения биомассы. Полученную биомассу дважды промывают водой для удаления выделенных нуклеиновых компонентов. Из полученного супернатанта выделяют нуклеиновые кислоты с помощью ионообменной хроматографии и получают денуклеинизированную биомассу. Эту биомассу направляют на вторую стадию кислотного гидролиза. Кислотный гидролиз осуществляют в реакторе, где суспензию биомассы нагревают до 72°С при постоянном перемешивании. Затем 15%-ным раствором HCl доводят рН до 2,0, а температуру суспензии до 87 °С и проводят кислотный гидролиз в течение 5 часов. В течение всего процесса гидролиза поддерживают температуру в реакторе 87 °С и рН 2,0. По окончании времени гидролиза полученную суспензию подвергают микрофилтрации. Полученный фильтрат подвергают распылительной сушке с получением сухого белкового продукта.

Пример 2.

Выращенную в ферментере биомассу метаноокисляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* (Bath) NCIMB 11132 концентрируют в сепараторе до концентрации 13-15 %, а затем подают на ультразвуковую обработку с использованием ультразвукового дезинтегратора и проводят обработку с частотой 21 кГц и акустической мощностью 120 Вт в течение 20 минут при температуре 5 °С. Далее полученную суспензию, содержащую разрушенные клетки, направляют в реактор, где нагревают и проводят первую стадию щелочного гидролиза, а именно нагревают до температуры 75 °С, затем аммиачной водой доводят рН до 9,1, догревают до 85 °С и проводят щелочной гидролиз в течение 90 минут. В течение всего времени поддерживают рН процесса на уровне 9,0 и температуру 85 °С. Для поддержания рН проводят автоматическую подтитровку перемешиваемой суспензии, температуру поддерживают с помощью термостата. Полученную биомассу дважды промывают водой для удаления выделенных нуклеиновых компонентов. Из полученного супернатанта выделяют нуклеиновые кислоты путем осаждения в изоэлектрической точке и получают денуклеинизированную биомассу. Эту биомассу направляют на вторую стадию кислотного гидролиза. Кислотный гидролиз осуществляют в реакторе, где суспензию нагревают до 75°С при постоянном перемешивании. Затем 15%-ным раствором HCl доводят рН до 2,2, а температуру суспензии до 90 °С и проводят кислотный гидролиз в течение 6 часов. В течение всего процесса гидролиза поддерживают температуру в реакторе 90 °С и рН 2,2. По окончании времени гидролиза полученную суспензию

подвергают микрофильтрации. По окончании времени гидролиза полученную суспензию подвергают микрофильтрации. Полученный фильтрат подвергают распылительной сушке с получением сухого белкового продукта.

Пример 3.

Выращенную в ферментере биомассу метаноокисляющих бактерий *Methylomonas methanica* концентрируют в сепараторе до концентрации 10-12 % АСВ, а затем подают на ультразвуковую обработку с использованием ультразвукового дезинтегратора и проводят обработку ультразвуком с частотой 20 кГц и акустической мощностью 150 Вт в течение 10 минут при температуре 7 °С. Далее полученную суспензию, содержащую разрушенные клетки, направляют в реактор, где нагревают и проводят первую стадию щелочного гидролиза, а именно, нагревают до температуры 80 °С, затем 2н раствором NaOH доводят рН до 8,5-8,6, догревают до 92 °С и проводят щелочной гидролиз в течение 110 минут. В течение всего времени поддерживают рН процесса на уровне 8,5-8,6 и температуру 92 °С. Для поддержания рН проводят автоматическую подтитровку перемешиваемой суспензии, температуру поддерживают с помощью термостата. По окончании времени гидролиза, полученную суспензию направляют на сепарацию или микрофильтрацию для отделения биомассы. Полученную биомассу дважды промывают водой для удаления выделенных нуклеиновых компонентов. Из полученного супернатанта выделяют нуклеиновые кислоты с помощью ионообменной хроматографии и получают денуклеинизированную биомассу. Эту биомассу направляют на вторую стадию кислотного гидролиза. Кислотный гидролиз осуществляют в реакторе, где суспензию биомассы нагревают до 70°С при постоянном перемешивании. Затем 15%-ным раствором HCl доводят рН до 2,0, а температуру суспензии до 92 °С и проводят кислотный гидролиз в течение 7 часов. В течение всего процесса гидролиза поддерживают температуру в реакторе 92 °С и рН 2,0. По окончании времени гидролиза полученную суспензию подвергают микрофильтрации. Полученный фильтрат подвергают распылительной сушке с получением сухого белкового продукта.

Характеристики сухого белкового продукта, полученного по примерам 1-3, представлены в таблице 1 и таблице 2.

Таблица 1. Физико-химические характеристики сухих белковых продуктов, получаемых по примерам 1-3

	<i>Methylococcus capsulatus</i> ГБС-15 (пример 1)	<i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath) NCIMB 11132 (пример 2)	<i>Methylomonas methanica</i> (пример 3)
Влажность, %	4-5	4-5	4-5
Зольность, %	5	4,5	5
Содержание сырого протеина, %	82	83	80
Содержание нуклеиновых к-т, %	2,0	2,0	1,9
Аминокислоты, %			

Cys2 (цистеин/цистин)	0,24	0,3	0,27
Asp (аспарагиновая кислота)	6,13	6,9	6,45
Met (метионин)	0,91	0,9	1,1
Thr (треонин)	2,45	1,9	2,5
Ser (серин)	1,93	1,98	2,01
Glu (глутаминовая кислота)	5,68	5,28	5,57
Pro (пролин)	2,62	2,35	2,22
Gly (глицин)	2,89	2,5	2,86
Ala (аланин)	4,4	4,3	4,23
Val (валин)	3,10	3,25	3,12
Ile (изолейцин)	2,18	2,05	2,15
Leu (лейцин)	3,66	3,95	3,84
Tyr (тирозин)	0,07	0,06	0,08
Phe (фенилаланин)	1,82	1,89	1,83
His (гистидин)	1,98	1,92	1,98
Lys (лизин)	2,71	2,72	2,75
Arg (аргинин)	2,91	2,95	2,93
Trp (триптофан)	-	-	-

Таблица 2. Характеристика сухих белковых продуктов, получаемых по примерам 1-3

Показатель	Пример 1	Пример 2	Пример 3
Органолептический контроль			
Цвет	От светло-кремового до бежево-коричневого	От светло-кремового до бежево-коричневого	От светло-кремового до бежево-коричневого
Запах	Свойственный продукту, специфический	Свойственный продукту, специфический	Свойственный продукту, специфический
Внешний вид	Мелкодисперсный порошок/ Допускается наличие легко рассыпающихся комочков		
Влажность, %	До 5	До 5	До 5
Зольность, %	До 5	До 5	До 5

Содержание сырого протеина, %	Не менее 80	Не менее 80	Не менее 80
Содержание нуклеиновых кислот, %	До 2	До 2	До 2

Получаемый белковый продукт имеет требуемые вкусовые и функциональные свойства, в том числе высокую растворимость в воде (полностью растворим) и высокую пенообразующую способность. Пенообразующие свойства получаемых продуктов согласно примерам 1-3 и белковой добавки по ближайшему аналогу определяли согласно ГОСТ 7635-85. Полученные данные приведены в таблице 3.

Таблица 3. Характеристика пенообразующей способности сухих белковых продуктов, получаемых по примерам 1-3 и стойкости пены.

Показатель	Аналог	Пример 1	Пример 2	Пример 3
Пенообразующая способность, %	118	125	122	127
Стойкость пены, %	18	20	20	20

Также полученный продукт обладает высокой пищевой ценностью, что позволяет использовать его в качестве белковой добавки при производстве функциональных пищевых продуктов.

Поскольку пищевая ценность белка определяется не только наличием в нем незаменимых аминокислот, но и их оптимальным количеством и соотношением, то для оценки сбалансированности и полноценности используют шкалу ФАО/ВОЗ, по которой был оценен белковый продукт, полученный по примеру 1 в сравнении с эталонным белком по ФАО/ВОЗ, а также белковой добавкой, полученной по ближайшему аналогу. Полученные данные отражены в таблице 4.

Таблица 4. Сравнение белкового продукта, полученного двух стадийным (щелочной/кислый) гидролизом по примеру 1, с эталонным белком по ФАО/ВОЗ и белковой добавкой по аналогу

Наименование аминокислоты	Эталонный белок по ФАО/ВОЗ, мг/г белка (2007 г.)	Содержание аминокислоты мг в 1 г белковой добавки по аналогу	Содержание аминокислоты мг в 1 г белкового продукта по примеру 1

Гистидин	15	20,30	22,23
Изолейцин	30	35,12	40,68
Лейцин	59	88,20	90,02
Лизин	45	47,08	50,05
Метионин + цистин	22	19,93	20,43
Фенилаланин + тирозин	30	102,36	110,94
Треонин	23	39,15	40,23
Триптофан	6	3,80	-
Валин	39	41,20	40,03
Сумма незаменимых аминокислот в 1 г белка	269,0	397,14	414,6

Таким образом, заявленным способом получают белковый продукт с высоким содержанием белка, сбалансированный по содержанию аминокислот, обладающий хорошими пенообразующими свойствами, позволяющими использовать его в качестве белкового ингредиента в пищевой промышленности.

Формула изобретения

1. Способ получения белкового продукта из биомассы метаноокисляющих бактерий, включающий выращивание биомассы метаноокисляющих бактерий, концентрирование, разрушение клеточной стенки, щелочной гидролиз, удаление нуклеиновых кислот, кислотный гидролиз, выделение белка, сушку, причем разрушение клеточной стенки проводят путем обработки ультразвуком с частотой 20-22 кГц и акустической мощностью 100-150 Вт в течение 10-20 минут при температуре 2-8 °С, щелочной гидролиз проводят при рН=8,5-9,3 температуре 85-95 °С в течение в течение 60-120 минут, а кислотный гидролиз при рН=1,9-2,2 температуре 85-95 °С в течение 4-8 часов.
2. Способ по п.1, в котором метаноокисляющие бактерии выбраны из группы *Methylococcus capsulatus*, *Methylomonas methanica* и другие.
3. Белковый продукт, полученный способом по пп.1-2, характеризующийся тем, что содержание компонентов в сухом остатке составляет, масс. %: белка – не менее 80, нуклеиновых кислот – не более 2, золы – не более 10, аминокислот – не менее 45.

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

Номер евразийской заявки:
202291369

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
A23J 1/00, C12N 1/20, 1/06, 1/08, 13/00, C12R 1/26, 1/265

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Espasenet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2091491 C1 (РОССИЙСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Д.И. МЕНДЕЛЕЕВА) 27.09.1997, реферат	1-3
D, A	RU 2681791 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ГИПРОБИОСИНТЕЗ") 12.03.2019	1-3
D, A	US 4007088 A (CESKOSLOVENSKA AKADEMIE VED) 08.02.1977, формула	1-3
A	RU 2195846 C2 (АКОПЯН ВАЛЕНТИН БАБКЕНОВИЧ и др.) 10.01.2003, реферат	1-3
A	GB 1513836 A (STANDARD OIL COMPANY) 14.06.1978, формула	1-3
A	CA 3047355 A1 (UNIBIO A/S) 28.06.2018, формула	1-3


последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 14 декабря 2022 (14.12.2022)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



Документ подписан
электронной подписью

Сертификат: 1653480328483
Владелец: СN=Аверкиев С.
Действителен: 25.05.2022-25.05.2023

С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202291369

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

A23J 1/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/06 (2006.01)
C12N 1/08 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12R 1/26 (2006.01)
C12R 1/265 (2006.01)