

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046503**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.21(51) Int. Cl. **C12N 1/20 (2006.01)**
C12P 7/66 (2006.01)(21) Номер заявки
202392477(22) Дата подачи заявки
2021.11.30**(54) ШТАММ METHYLOCOCCUS CAPSULATUS MC19 - ПРОДУЦЕНТ БЕЛКОВОЙ МАССЫ**(31) **2021109310**(56) **WO-A1-2006028852**
WO-A2-0220728(32) **2021.04.05**(33) **RU**(43) **2023.12.26**(86) **PCT/RU2021/050403**(87) **WO 2022/216176 2022.10.13**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"БИОПРАКТИКА" (ООО
"БИОПРАКТИКА") (RU)**OVERLAND MARGARETH ET AL.:
"Evaluation of methane-utilising bacteria products
as feed ingredients for monogastric animals",
АРХИВЫ ПИТАНИЯ ЖИВОТНЫХ, об. 64,
нет. 3, 1 июня 2010 г. (2010-06-01), стр.
171-189, XP055883588, US ISSN: 1745-039X,
DOI: 10.1080/17450391003691534 Взято из
интернета: URL : [https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/17450391003691534?](https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/17450391003691534?needAccess=true)
needAccess=true>реферат(72) Изобретатель:
**Чеканова Дарья Алексеевна,
Патрушева Елена Викторовна,
Новикова Валерия Алексеевна,
Бондаренко Павел Юрьевич,
Шестаков Андрей Иннокентьевич,
Пыркин Владислав Олегович,
Любимов Иван Сергеевич, Портнов
Сергей Александрович, Новиков
Станислав Николаевич (RU)**(74) Представитель:
Куприянова О.И. (RU)(57) Изобретение относится к биотехнологии, микробиологической промышленности и касается метанотрофного штамма *Methylococcus capsulatus*. Штамм *Methylococcus capsulatus* MC19 (VKM В-3493D) продуцент белка одноклеточных получен в условиях непрерывного культивирования в биореакторе в метано-воздушной атмосфере при постоянном протоке питательной среды. Штамм способен осуществлять конверсию моноуглеродных соединений и содержит в биомассе не менее 80% сырого протеина, антиоксидантов: убихинонов/олов Q8/Q8-2H - до 9,287/8,043 и Q9/Q9-2H- до 0,614/0,249 мг/г с.в., витаминов группы В в биомассе: В2 - около 3 мг/г с.в, В3 - до 15 мг/г с.в, В12 - около 1,1 мг/г с.в. Практически может быть использован для повышения эффективности белковой биомассы путем обогащения её экологически чистым белковым концентратом с наличием витаминов и антиоксидантов.**B1****046503****046503****B1**

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, микробиологической промышленности и касается метанотрофного штамма *Methylococcus capsulatus*, позволяющего получать биомассу, которая помимо белка содержит антиоксиданты и витамины группы В, повышающие биологическую ценность белка, который может быть использован в животноводстве в качестве кормовой добавки, аквакультуры, в пищевой промышленности в качестве пищевой добавки, в микробиологической промышленности в качестве компонента питательных сред, а также для использования в спортивном и диетическом питании.

Уровень техники

Белок служит полезным источником минеральных веществ, витаминов, жиров и углеводов. В качестве источника белка достаточно часто используют белки животного происхождения (рыбная мука, костная мука). Альтернативой белку животного происхождения может служить белок микробного происхождения. По многим важным показателям биомасса микроорганизмов обладает весьма высокой питательной ценностью. Крупномасштабное культивирование промышленных микроорганизмов и использование их биомассы - один из основных источников белка для человека и животных. Сырьевая база микроорганизмов практически неисчерпаема, рост биомассы является интенсивным, состав белка одноклеточных весьма постоянен, и он, как правило, сбалансирован по аминокислотному составу.

Использование бактерий в качестве продуцента кормового белка является более эффективным, например, прокариотические организмы образуют не менее 70% белка по массе, по сравнению с дрожжами, которые образуют не более 60% белка от биомассы. Различные виды микроорганизмов являются продуцентами полноценного белка и витаминов, включая метанотрофные бактерии - микроорганизмы, растущие на природном или попутном газе, такие как *Methanomonas carbonatophila*, *Methanomonas methanooxidans*, *Methylomonas methanica*, *Methylocystis parvus*, *Methylococcus capsulatus*. Качество белка, получаемого с использованием метанотрофных бактерий, эквивалентно белкам животного и растительного (на основе сои) происхождения. Это позволяет широко использовать его в качестве заменителя муки как животного, так и растительного происхождения.

Наиболее активным продуцентом белковой биомассы на природном газе является вид *Methylococcus capsulatus*. К недостаткам данного вида метанотрофа можно отнести нестабильность его роста на природном газе при длительном культивировании в условиях проточного режима, что снижает продуктивность процесса и выход готового продукта. Данную проблему решают штаммы *Methylococcus capsulatus* ГБС-15, *Methylococcus capsulatus* КОНЦЕПТ-8, *Methylococcus capsulatus* ЛБТИ 028 которые обладают рядом свойств, обеспечивающих более стабильный рост в процессе культивирования (патент РФ № 2613365, патент РФ № 2706074, патент РФ № 2728345).

Известно, что бактерии, дрожжи и дрожжеподобные микроорганизмы могут являться продуцентами антиоксидантных пигментов. К числу природных антиоксидантов (ингибиторов процессов окисления) относятся убихиноны (УХ) (коэнзим Q) (Мосичев М.С., Матвеев Д.А., Белов А.П. // Прикладная биохимия и микробиология 1994 - том.3. - вып.3 - с.430-435., Landi L., Cabrini L., Sechi A.M. et al. // Biochem. J. 1984 - V.222 - №2 -P.463-466., Landi L., Carhini L., Tadolini B. et al. // Ital. J. Biochem. 1985 - V.34 - V.5 -P.356-363.

Убихинон является веществом, необходимым для поддержания биологических функций в качестве компонента электронной транспортной системы, а также, как известно, участвует в активации производства АТФ, антиокислительной активности в организме и стабилизации мембран и может являться инструментом для усиления продукции энергии в митохондриях, повышения антиоксидантной функции организма и поддержания гомеостаза. Соединения стабилизируют мембраны и белки, защищают клетки от УФ-излучения, сорбируют тяжелые металлы, а для человека и животных являются провитаминами, иммуностимуляторами и адаптогенами. Производство и использование кормов, содержащих убихиноны, обладающих лечебно-профилактическим действием, позволяет повысить уровень адаптационной защиты организма к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды.

Известны способы получения убихинонов Q₇, Q₈, Q₁₀ с использованием пурпурных фототрофных микроорганизмов (Авт. св. СССР 1398398) и Q₉ (Авт. св. СССР 1353808) с последующей очисткой в концентрациях 2.2. - 4.3 мг/г сухого веса. Несмотря на то, что при культивировании фототрофных микроорганизмов используются минеральные среды простого состава, получение белка в промышленных масштабах сопряжено со значительными энергозатратами, что отражается на стоимости получаемой биомассы.

Дополнительным преимуществом белка одноклеточных организмов по сравнению с белками животного происхождения является наличие витаминов группы В (особенно это относится к витамину В12) в количествах, обеспечивающих потребность в них животных. В частности, в качестве белкового корма микробного происхождения, содержащего витамины группы В известно использование молочнокислых, пропионовокислых бактерий и бифидобактерий (например, патент РФ № 2244000, патент РФ № 2270248, патент РФ № 2390554, патент РФ № 2250258, патент РФ № 2392312). Однако для производства биомассы из данных бактерий необходимо использование дорогих субстратов, при этом накапливаемая биомасса характеризуется недостаточной высокой концентрацией, а, следовательно, недостаточным количеством белка (не более 50%), которое могло бы образоваться культурой.

Таким образом, из перечисленных микроорганизмов для промышленного производства биомассы наиболее предпочтительно использование метанотрофных бактерий, которые в подходящих условиях активно перерабатывают природный газ, быстро размножаются и наращивают свою биомассу, богатую ценным белком, витаминами и иными биологически активными веществами. Биомасса *Methylococcus capsulatus* характеризуется высоким уровнем сырого протеина (не менее 70%), а также похожим на рыбную муку соотношением аминокислот, что позволяет использовать ее как источник белковой массы. Испытания белкового премикса 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. Ветеринарными и санитарно-гигиеническими исследованиями установлена доброкачественность и безвредность продуктов животноводства, птицеводства и рыбоводства, полученных при использовании кормов с биомассой метанооксиляющих бактерий.

Наиболее близким к заявляемому изобретению является штамм *Methylococcus capsulatus* ГБС-15, номер депонирования ВКПМ В-12549 (патент РФ № 2613365). Данный штамм обладает рядом свойств, обеспечивающих более стабильный рост в процессе культивирования, показана его фагоустойчивость на воде из разных внешних источников и при выращивании его в атмосфере природного газа разного состава (с содержанием метана от 85 до 99,9% об.). Штамм *Methylococcus capsulatus* ГБС-15 растет на минеральных средах, при этом достигается концентрация биомассы 32 г/л и скорость потока 0,25 ч⁻¹. Упомянута возможность синтеза убихинона (преимущественно Q7 и Q8).

Однако качественно-количественный состав синтезированных штаммом коэнзимов не подтвержден экспериментально. Кроме того, отсутствуют данные о наличии и количественном содержании в получаемой биомассе витаминов группы В, которые повышают питательную ценность продуцируемого микроорганизмами белка.

Технической проблемой, решаемой заявляемым изобретением является получение штамма содержащего антиоксиданты (убихиноны/олы) в концентрациях, сопоставимых с природными продуцентами дрожжевых культур и фототрофных микроорганизмов, с учетом особенностей культивирования и содержания белка у последних; а также витамины группы В, а именно В2, В3 и В12 не ниже чем у природных штаммов молочнокислых, пропионовых и бифидобактерий способных к синтезу витаминов, но уступающих в скорости роста и условиях культивирования. Это достигается путем культивирования *Methylococcus capsulatus* МС19 на средах разного состава.

Раскрытие изобретения

Техническим результатом заявляемого изобретения является получение штамма, обладающего повышенной биологической активностью, которая достигается:

высоким содержанием сырого протеина;

способностью к внутриклеточному биосинтезу витаминов В2, В3, В12;

антиоксидантной активностью за счет синтеза коэнзимов Q8, Q9.

Заявляемый штамм позволяет получать биомассу, которая помимо белка содержит антиоксиданты и витамины группы В, повышающие биологическую ценность белковой массы. Штамм *Methylococcus capsulatus* МС19 осуществляет конверсию моноуглеродных соединений и содержит в биомассе не менее 80% сырого протеина, антиоксидантов не менее: убихинонов/олов Q8/Q8-2Н - 9,0/8,0 и Q9/Q9-2Н - 0,6/0,2 мкг/г с.в., витаминов группы В в биомассе не менее: В2 -3 мг/г с.в., В3 -15 мг/г с.в., В12 - 1,0 мг/г с.в. Штамм стабильно продуцирует витамины группы В и коэнзимы на средах различного состава. При этом штамм *Methylococcus capsulatus* МС 19 сохраняет высокую скорость роста - не ниже 0,25 час⁻¹, способность накапливать белок в концентрациях не ниже 80%.

Всё вышеизложенное свидетельствует о перспективности использования метанотрофов на основе штамма *Methylococcus capsulatus* МС19. Это позволяет создать полноценный источник микробной белковой массы с повышенной биологической ценностью для народного хозяйства.

Технический результат достигается штаммом, полученным селекционным путем из образца культуры метанооксиляющих микроорганизмов на основе штамма *Methylococcus capsulatus*, в условиях непрерывного культивирования в биореакторе в метано-воздушной атмосфере при постоянном протоке питательной среды, депонированного в ФГБУН институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) с присвоенным идентификатором ВКМ В-3493D (VKM В-3493D).

Осуществление изобретения

Штамм *Methylococcus capsulatus* МС19 получен в результате селекции по способности к биосинтезу в значительных количествах антиоксидантов и витаминов группы В при непрерывном культивировании из штамма *Methylococcus capsulatus* ВСБ-874 и образцов ассоциаций метанооксиляющих микроорганизмов, которые сохранялись и поддерживались в научных лабораторных коллекциях (Патент SU № 770200). Штамм *Methylococcus capsulatus* МС19 в составе микробного сообщества непрерывно культивировался в течение 6-ти лет. Процесс непрерывного культивирования происходил в лабораторных ферментерах, с протоком питательной среды 0,2-0,3 ч⁻¹, в метано-воздушной атмосфере (соотношение метан:воздух 25-30:75-70), на минеральной среде с источником фосфора в виде ортофосфорной кислоты, с

источником азота в виде водного раствора аммиака, используемого в качестве титранта. Питательная среда следующего состава (г/л): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12, KCl 0.07, K_2SO_4 0.03; микроэлементы, мг/л: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2.375, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 5, H_3BO_3 2.5, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1, $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.18, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.18, $CaCl_2$ - 0.083 г/л; H_3PO_4 85% - 0.2 мл/л. Растворённый кислород поддерживался в диапазоне 0,3 - 1,0 мг/л; растворённый углекислый газ был на уровне 48 - 60 мг/л. Продуктивность достигала 4,5 г абсолютно сухого веса/л*ч. Культивирование происходило в биореакторах 25 л и 12 л объёма с мешалкой идеального перемешивания и в биореакторе объёмом 20 л при высокопроизводительных условиях.

Штамм идентифицирован до вида с помощью анализа 16S РНК.

Штамм характеризуется следующими признаками.

Культурально-морфологические признаки. *Methylococcus capsulatus* MC19 грамотрицательные неподвижные кокки размером 0,8×1,0 мкм, обычно встречающиеся парами. Способны к образованию капсулы. Имеют покоящуюся стадию в виде цист. Культура на агаризованной среде образует мелкие колонии диаметром 1,0-1,5 мм, прозрачные, выпуклые с ровным краем. Цвет колоний варьирует от кремового до светло-оранжевого. Цвет в жидкой среде - кремово-розовый.

Физиолого-биохимические особенности. Штамм относится к термотолерантным микроорганизмам с температурным оптимумом 42°C, хотя рост может происходить при температуре от 37 до 52°C. Аэроб. Имеет строго дыхательный тип метаболизма с использованием кислорода в качестве конечного акцептора электронов. В качестве единственного источника углерода и энергии использует метан или метанол. В качестве источника азота предпочитательнее соли аммония, хотя может расти на нитратах. Обладает нитрогеназной активностью. Способен к автотрофной фиксации CO_2 . Ионы металлов меди, кобальта, никеля, железа, в меньшей степени цинка в концентрации 10 мкМ оказывают ингибирующее действие на НАДН-оксидоредуктазу что может служить механизмом токсического действия по отношению к бактериям (Саратовских и др., 2005, 2007). Внутриклеточные мембраны расположены в виде стопок везикулярных дисков, характерных для метанотрофов I типа (по классификации Whittenbury. R).

Штамм непатогенный.

Methylococcus capsulatus MC19 является генетически стабильным организмом без известных плазмид. Генетические манипуляции со штаммом не проводились.

Область промышленного применения штамма - кормовой продукт для животноводства, птицеводства и аквакультуры, пищевая добавка, микробиологическая промышленность.

Штамм может быть рекомендован для разработки эффективных методов обогащения кормов витаминами, антиоксидантами, белком и другими биологически активными продуктами микробного происхождения.

Изобретение подтверждено следующими примерами.

Пример 1. Для культивирования *Methylococcus capsulatus* MC19 VKM В-3493D применяют питательные среды следующего состава, г/л:

Среда AMS: $MgSO_4$ 1.0, Na_2HPO_4 0.717, KH_2PO_4 0.272, NH_4Cl 0.5, $CaCl_2$ 0.02;

Среда NMS: $MgSO_4$ 1.0, Na_2HPO_4 0.717, KH_2PO_4 0.272, KNO_3 1.0, $CaCl_2$ 0.02.

В среды добавляется 0.1% раствора микроэлементов, содержащего (г/л): EDTA 5.0; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.03; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2; $CuCl_2 \cdot 5H_2O$ 0.1; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02; Na_2MoO_4 0.03. pH до 5,6-6,0.

Культивирование проводят следующим образом. В колбу объём 500 мл вносят 50 мл среды и инокулируют 5%. Условия культивирования: 41,5-42°C, метан-воздух 1:1, скорость перемешивания 160 об/мин.

Через 10 суток культивирования биомасса содержит сырого протеина на средах NMS 82% и AMS 79%.

Пример 2. Штамм *Methylococcus capsulatus* MC19 VKM В-3493D был оценен по содержанию убихинонов (CoQ8-10)/убихинолов (CoQ8-9H₂) путем культивирования его на жидких питательных средах.

Условия культивирования и используемые питательные среды как в примере 1. Время культивирования 3 суток.

Идентификацию убихинонов/олв проводят методом ВЭЖХ-МС/МС на колонка С18, изократическом элюирование 100% 5 мМ формиатом аммония в метаноле с 0,1% муравьиной кислоты. Детектирование осуществляют по ионным переходам (MRM), прекурсор-ионы - аддукты убихинонов(олов) с NH_4^+ ; условия ионизации оптимизированы по стандарту Q10. Качественную идентификацию Q8,9 проводят по массе ионных осколков, которые у гомологов одинаковы, и отличаются в массе прекурсор-иона. Также качественная идентификация веществ без стандартов проводится по времени удерживания на колонке. Пробоподготовку образцов для определения убихинонов(олов) проводят следующим образом. Разные объёмы культуральных жидкостей, в зависимости от концентрации культуры, центрифугируют, осадок взвешивают, добавляют 5 частей ацетона, дезинтегрируют в ультразвуковой ванне 15 мин. Затем перемешивают на мультишейкере 15 мин. Гомогенезат охлаждают при -20°C 20 мин и осаждают центрифугированием при +4°C 3000 об/мин в течение 3 мин, отбирают в планшет на анализ. Содержание убихи-

нонов (CoQ8-10)/убихинолов (CoQ8-9H2) в биомассе мкг/г св.:

Убихиноны/убихинолы	Среда AMS	Среда NMS
Q8	9,287	2,495
Q8-2H	8,043	5,676
Q9	0,614	-
Q9-2H	0,249	-
Q10	-	-

Пример 3. Штамм *Methylococcus capsulatus* MC19 VKM В-3493D был оценен по способности синтезировать витамины группы В путем культивирования его на жидких минеральных средах в условиях, указанных в примере 1.

Количественное определение витаминов В1, В2, В3 никотинамид, В3 никотиновая кислота, В5, В6, В7, В12 в культуральной жидкости (супернатанте и биомассе) осуществляют ВЭЖХ-МС/МС методом.

Хроматографическое разделение производят на колонке YMC-Triart C18, 50×2.0 мм, 3 мкм (YMC, Japan) со встроенной пред колонкой SecurityGuard ULTRA C18 2.1мм (Phenomenex, USA) при 40°C. Подвижной фазой А был 10 мМ раствор формиата аммония с добавлением 0.1% муравьиной кислоты, Б - ацетонитрил с добавлением 0.1% муравьиной кислоты. Используют градиентное элюирование. Скорость подвижной фазы и объем закола составляет 350 мкл/мин и 1 мкл соответственно. Общее время анализа составляет 6 минут. В работе используют ионизацию электроспреем (ESI) в позитивном режиме. Пробо-подготовку образцов для определения витаминов В1, В2, В3 НАС, В3 НАМ, В6, В7, В12 проводят следующим образом. 4 - 30 мл культуральной жидкости, в зависимости от концентрации культуры в образце, переносят в флаконы объемом 15/50 мл, центрифугируют 15 мин, 3900 об/мин 1 мл супернатанта отбирают в эппендорф объемом 1.5 мл, направляют на повторное центрифугирование 15 мин, 14680 об/мин. Полученный раствор переливают в 96 луночный планшет на ВЭЖХ-МС/МС анализ для определения концентрации витаминов в культуральном супернатанте. Для определения концентрации витаминов в биомассе, осевшую после первичного центрифугирования культуру декантируют, взвешивают, ресуспендируют в 5-ти частях деионизированной воды. Полученную суспензию переливают в полипропиленовую пробирку объемом 2 мл с плотно закручивающейся резьбовой крышкой с резиновой прокладкой, центрифугируют 15 мин, 14680 об/мин, супернатант отбирают на ВЭЖХ-МС/МС анализ для определения концентрации остаточных в межклеточном пространстве биомассы витаминов. Открученную пробу повторно ресуспендируют и направляют на термошейкер на 60 мин, 800 об/мин, 100°C для экстракции витаминов из бактерий. После образец направляют на центрифугирование 15 мин, 14680 об/мин и на ВЭЖХ-МС/МС анализ.

Содержание витаминов группы В при культивировании штамма на среде NMS:

Витамины группы В	Концентрация витаминов в супернатанте, нг/мл	Концентрация витаминов в биомассе, мкг/г с.в.
В1	<10	<10
В2	<50	2 842.50
В3 НАС (никотиновая кислота)	<50	<50
В3 НАМ (никотинамид)	<20	15 050.00
В6	<5	<5
В7	<200	<200
В12	<20	1 097.50

Содержание витаминов группы В при культивировании штамма на среде AMS:

Витамины группы В	Концентрация витаминов в супернатанте, нг/мл	Концентрация витаминов в биомассе, мкг/г с.в.
В1	<10	<10
В2	<50	<50
В3 НАС (никотиновая кислота)	<50	<50
В3 НАМ (никотинамид)	<20	2 610.00
В6	<5	<5
В7	<200	<200
В12	<20	98.30

Выращивание культуры *Methylococcus capsulatus* MC19 VKM В-3493D в ферментере эжекционного типа объемом 40 л (рабочий объем - 25 л) с непрерывной подачей жидких минеральных сред в условиях, указанных в примере 1 при повышенном давлении - 6 атм. позволило получить сопоставимое содержа-

ние белка, витаминов В2, В3, В12 и убихинонов Q8, Q9 в биомассе, как и при выращивании при атмосферном давлении.

Представленные примеры характеризуют штамм *Methylococcus capsulatus* MC19 VKM В-3493D, как продуцент с высоким содержанием белка, витаминов В2, В3, В12 и убихинонов Q8, Q9 в биомассе на любом виде сред.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штамм *Methylococcus capsulatus* MC19 VKM В-3493D - продуцент белковой биомассы.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
