



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 080 382** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) МПК<sup>6</sup> **C 12 N 1/20, C 12 P 7/06//C  
12 P 7/06, C 12 R 1:145)**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 95103597/13, 13.03.1995

(46) Дата публикации: 27.05.1997

(56) Ссылки: 1. Авторское свидетельство СССР N 1604852, кл. C 12P 7/00, 1990. 2. Лукина Г.П., Ежова И.Е., Гуськова Н.П. Способ повышения выхода н-бутилового спирта в ацетонобутиловом производстве. - Микробиологическая промышленность, 1983, N 6, с.37 - 38.

(71) Заявитель:

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов

(72) Изобретатель: Лукина Г.П., Абилов С.К., Любимова И.К., Великая М.А., Ежова И.Е., Артюшкина Т.В.

(73) Патентообладатель:

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM-ПРОДУЦЕНТ Н-БУТИЛОВОГО СПИРТА И АЦЕТОНА

(57) Реферат:

Использование: биотехнология, в различных отраслях, преимущественно для синтеза н-бутилового спирта и ацетона. Сущность изобретения: предложенный штамм *C. acetobutylicum* (ВКПМ В 5359) селекционирован путем индуцированного мутагенеза и последующего отбора мутантных клонов на селективных средах.

Штамм *C.acetobutylicum* S-3716 (ВКПМ В 5359) при ферментации в течение 36-40 ч на среде, содержащей свеклосахарную мелассу с минеральными солями, накапливает в культурной жидкости 22,0 г/л растворителей, в том числе 15,5 г/л - н-бутанола и 6,5 г/л ацетона. Конверсия углеводов в целевые продукты составляет 40%. 1 табл.

RU 2 0 8 0 3 8 2 C 1

RU 2 0 8 0 3 8 2 C 1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 080 382** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **C 12 N 1/20, C 12 P 7/06/(C  
12 P 7/06, C 12 R 1:145)**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 95103597/13, 13.03.1995

(46) Date of publication: 27.05.1997

(71) Applicant:

Gosudarstvennyj nauchno-issledovatel'skij  
institut genetiki i seleksii promyshlennykh  
mikroorganizmov

(72) Inventor: Lukina G.P.,

Abilev S.K., Ljubimova I.K., Velikaja M.A., Ezhova  
I.E., Artjushkina T.V.

(73) Proprietor:

Gosudarstvennyj nauchno-issledovatel'skij  
institut genetiki i seleksii promyshlennykh  
mikroorganizmov

(54) STRAIN OF BACTERIUM CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM - A PRODUCER OF NORMAL BUTYL ALCOHOL AND ACETONE

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, microbiology.  
SUBSTANCE: invention proposes the strain C.  
acetobutylicum (VKPM B-5359) that is  
selected by induced mutagenesis and the  
following mutant clones selection on  
selective media. Strain C. acetobutylicum

S-3716 (VKPM B-5359) accumulates 22.0 g/l  
solvents including 15.5 g/l n-butanol and  
6.5 g/l acetone at fermentation for 36-40 h  
on medium containing beet-sugar molasses and  
mineral salts. Carbohydrate conversion to  
the end products is 40%. EFFECT: enhanced  
effectiveness of the strain proposed. 1 tbl

RU 2 0 8 0 3 8 2 C 1

RU 2 0 8 0 3 8 2 C 1

Изобретение относится к микробиологической промышленности и касается получения нового штамма *S. acetobutylicum*, продуцирующего *n*-бутиловый спирт и ацетон.

*n*-Бутиловый спирт (*n*-бутанол) и ацетон применяется в многих отраслях народного хозяйства. В качестве растворителей используются в лакокрасочной промышленности, в производстве синтетической резины, шелка, при экстрагировании фармацевтических препаратов и других отраслях. Используются также в качестве сырья для синтеза ряда органических продуктов, а также в виде жидкого топлива.

*n*-Бутиловый спирт и ацетон могут быть получены и химическим способом, однако качество синтетического бутилового спирта, полученного на заводах синтетического каучука невысокие из-за значительного содержания в нем непредельных соединений. В связи с этим, такие спирты не находят применение в ряде отраслей промышленности, например в лакокрасочной, фармацевтической и др. потребность которых в высококачественном *n*-бутиловом спирте покрывается *n*-бутанолом, полученным способом микробиологического синтеза.

*n*-Бутиловый спирт, получаемый брожением, представляет собой первичный бутиловый спирт ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$ ), химическая же промышленность, вырабатывающая *n*-бутанол, получает в процессе синтеза наряду с *n*-бутиловым спиртом и вторичный бутиловый спирт ( $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-CH}_3$ ).

Известно, что бактерии *S. acetobutylicum* при ображивании различных углеводов синтезируют одновременно три целевых продукта: *n*-бутиловый спирт, ацетон и этиловый спирт, получившие общее название органические растворители, процентное соотношение которых примерно 60:30:10 (соответственно). Это соотношение не является строго постоянным и может значительно варьировать в сторону увеличения выхода того или иного продукта брожения.

Наиболее ценным из органических растворителей является *n*-бутиловый спирт.

Получение повышенного выхода *n*-бутилового спирта при наименьших затратах было предметом многочисленных исследований и в настоящее время является одной из важных задач ацетоно-бутилового производства.

Существующее промышленное производство микробиологического синтеза *n*-бутилового спирта и ацетона основано на использовании ацетоно-бутиловых бактерий, относящихся к роду *Clostridium*.

На протяжении многих лет основным направлением исследований в нашей стране по интенсификации и удешевлению производства *n*-бутилового спирта была замена пищевого сырья непищевым с одновременной адаптацией культуры *S. acetobutylicum*, выделенной еще в 30-е годы [1] Однако и в настоящее время на отечественных предприятиях при получении растворителей микробиологическим способом используют в основном муку злаковых культур.

Известен штамм *S. acetobutylicum* [2]

который за 66 ч брожения на мучных средах накапливает в культурной жидкости 13,5-15,5 г/л органических растворителей, в том числе *n*-бутилового спирта 9-10 г/л, ацетона 3,5-4,0 г/л и этанола 1,0-1,5 г/л.

Известен способ с использованием штамма *S. acetobutylicum* ATCC 824, продуцирующего на средах с глюкозой 7,5 г/л *n*-бутилового спирта и 3,7 г/л - ацетона [3]

Сообщается о штамме 34- II *S. acetobutylicum*, продуцирующим за 54 ч брожения 9,5 г/л бутанола и 4,6 г/л ацетона [4]

Имеются сообщения о штаммах мутантах *S. acetobutylicum* накапливающих на мучных средах за 66 ч брожения 9-10 г/л *n*-бутанола, 4,3-4,9 г/л ацетона и 1,3-1,9 г/л этанола [5]

Общим недостатком перечисленных штаммов-продуцентов *n*-бутанола и ацетона является невысокий уровень накопления целевых продуктов, а также присутствие третьего продукта этанола, что усложняет технологический процесс выделения конечных продуктов. Кроме того, все эти штаммы требуют добавления в среды пищевого сырья муки или отрубей, а также большое количество минеральных добавок.

Установленным фактом в исследованиях процесса ацетоно-бутилового брожения является то, что на выход растворителей и долевое соотношение целевых продуктов в значительной степени влияет состав сырья, используемого для брожения.

Так при культивировании на мучных средах различные штаммы *S. acetobutylicum* синтезируют достаточно высокое общее количество растворителей, которое составляет 18-19 г/л, в том числе 11-12 г/л и 4-5 г/л ацетона Кроме того, на средах из муки обязательно синтезируется 1,5-2,5 г/л этанола [6 и 7]

Известен способ повышения выхода растворителей при культивировании бактерий *S. acetobutylicum* на мучных средах за счет предварительного разжижения крахмала рециркулируемой бражкой, содержащей активные амилалитические ферменты. При этом общий выход растворителей достигает 19 г/л, а время брожения сокращается на 9 ч [8]

За рубежом в последние годы, в связи с энергетическим кризисом, появляется большой интерес к получению растворителей методом брожения (США, Канада, АРЕ, ФРГ, Япония, Франция и др.). По имеющимся сведениям из технической литературы (за 1985-1994) *n*-бутанол и ацетон во многих странах получают синтетическим путем, бродильные производства становятся выгодными, благодаря использованию возобновляемых источников энергии и побочных продуктов (газов брожения).

Основными направлениями исследований за рубежом являются: конструирование новых штаммов ацетонобутиловых бактерий методами генетической инженерии [9-11] разработка новых технологических приемов по выделению конечных целевых продуктов [12]

Описаны штаммы мутанты *S. acetobutylicum* (ATCC 39058), продуцирующие на искусственной питательной среде с глюкозой 12-17 г/л растворителей, в том числе 10-12 г/л бутанола и 4,0-5,0 г/л ацетона. Культивирование одного из мутантов на среде

с израильским артишоком позволило получить бутанола до 15 г/л [11]

Максимальные известные уровни биосинтеза *n*-бутилового спирта и ацетона составляют 15,0 г/л и 10/л (соответственно) [11] 14 г/л *n*-бутанола и 7,6 г/л ацетона [13] и 15,1 г/л *n*-бутанола и 6,3 г/л ацетона [14] Однако такие результаты получены в лабораторных экспериментах с использованием искусственных сред, экзотических иноулиновых субстратов (бугорки земляной груши, георгина, корни цикория и др.) и гидролизатов отходов зерновых производств, которые не нашли промышленного использования.

В нашей стране одним из основных направлений исследований в области ацетонобутилового производства является поиск сырья, заменяющего полностью или частично пищевое сырье, муку.

Наиболее подходящим сырьем для условий отечественного производства и возможностей сырьевой базы является свеклосахарная меласса отход свеклосахарного производства.

Наилучшим продуцентом, растущим на свеклосахарной мелассе, является штамм *C. acetobutylicum* S [15] выбранный в качестве прототипа.

Штамм позволяет получать 11 г/л *n*-бутанола и 3,4 г/л ацетона на питательной среде, имеющей следующее соотношение компонентов, мас. свеклосахарная меласса (по содержанию сахарозы и редуцирующих веществ) 4,4 (44 г/л), сернокислый аммоний  $6 \times 10^{-2}$  (0,6 г/л), суперфосфатная вытяжка (по содержанию  $P_2O_5$   $2,6 \cdot 10^{-2}$  (0,26 г/л) и углекислый кальций 1,0 (10 г/л). Процесс брожения проходит 42 ч, несброженными в среде остались 0,64% сахаров.

Недостатком штамма-продуцента является невысокий выход *n*-бутанола и низкий выход ацетона, а так же значительное содержание несброженных сахаров. Конверсия углеводов в целевой продукт составила лишь 34% от введенных в среду углеводов.

Задачей изобретения является создание нового штамма, позволяющего получать высокий выход *n*-бутанола и ацетона на средах, не содержащих пищевое сырье, и повышение конверсии углеводов в целевые продукты.

Поставленная цель достигается получением нового штамма *C. acetobutylicum* S-3716 продуцента *n*-бутанола и ацетона.

Предлагаемый штамм *C. acetobutylicum* S-3716 позволяет за 36-40 ч получить до 15,5 г/л *n*-бутанола и до 6,5 г/л ацетона на средах с мелассой и минеральными солями, при этом конверсия углеводов в целевые продукты достигает 40%

Новый штамм получен из штамма *C. acetobutylicum* S [15] путем индуцированного мутагенеза и последующего отбора мутантных клонов на селективных средах. Отбор мутантов проводился по следующим признакам: устойчивость к повышенным концентрациям бутанола, недостаточность по образованию жирных кислот, устойчивость аллиловому спирту. Все эти признаки прямо или косвенно связаны с биосинтезом бутанола и ацетона.

Споры бактерий *C. acetobutylicum* S, находящиеся в стеклянной запаянной

пробирке, активируют нагреванием в кипящей водяной бане в течение 1 мин и инокулируют в картофельную среду. Через 18 ч брожения при 37°C бактерии пересевают на полноценную синтетическую среду (ПСС). ПСС имеет следующий состав, г/л:  $K_2HPO_4$  0,7;  $KH_2PO_4$  0,7;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  20 мг;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  15 мг NaCl 10 мг, глюкоза 20, ацетат аммония 3, дрожжевой экстракт 1, бактотриптон 1, цистеин 0,5. Для получения плотной среды к ПСС добавляют агар концентрации 1,2-1,5%

В ПСС бактерии выращивают до середины логарифмической фазы в анаэробных условиях. Затем добавляют *N*-метил-*N*-нитро-*N*-нитрозогуанид (МННГ) или этилметансульфонат (ЭМС) в концентрациях 0,2-1% Через 0,5-2 ч бактерии отмывают от питательной среды и от мутагенов.

Отмытые от мутагена бактерии высевают на чашки с картофельным агаром или агаризованной ПСС или агаризованной мелассной средой, содержащими бутанол (15-20 г/л) или другие добавки для сбора соответствующих мутантов. Через 72 ч инкубирования в анаэробных условиях отбирали колонии бактерий, выросших на агаризованных средах с наибольшей концентрацией бутанола и изучают способность этих клонов ображивать мелассные среды, а также уровень их споруляции. Всего исследовано 380 клонов с целью отбора высокопродуктивных форм.

Для определения концентрации целевых продуктов в сброженной среде используют газовый хроматограф "Хром-4" с пламенно-ионизационным детектором и колонкой с полисорбом.

Продуктивность нового штамма в сравнении с штаммом-прототипом представлена в таблице.

Новый штамм продуцент *n*-бутанола и ацетона *Clostridium acetobutylicum* S-3716 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов и имеет регистрационный номер ВКПМ В 5359.

Штамм *C. acetobutylicum* S-3716 имеет следующие культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки.

Морфология клеток.

Молодые вегетативные клетки грамположительные, хорошо подвижные. Клетки бактерий палочковидные одиночные, парно и цепочками. Размер и форма клеток зависит от возраста культуры. В процессе развития (начальный период) образует длинные цепочки, в дальнейшем распадаются на отдельные клетки.

Размер молодых вегетативных клеток:  $d=1,0-1,2$  мкм,  $l=5-7$  мкм. Обладает бациллярном типом спорообразования, форма клеток перед спорообразованием не изменяется. Споры овальные:  $d=2,5$  мкм,  $l=3-5$  мкм, локализуются в клетке терминально.

Культурно-морфологические признаки на разных средах.

Картофельная среда с глюкозой и агаром. Через 44 ч роста при 36°C в анаэробных условиях образует круглые с ровными краями колонии диаметром 1,0-2,0 мм. Структура колоний однородная, серовато-белого цвета, не прозрачные, поверхность гладкая, выпуклая, жирно-блестящая.

Мелассная агаризованная среда с

минеральными солями. Через 44 ч роста при 36°C в анаэробных условиях образует колонии диаметром от 1,0 мм до точечных размеров, серовато-белые, не прозрачные, круглые, края ровные, поверхность гладкая, выпуклая жирно-блестящая.

Полноценная синтетическая среда.

Через 44 ч роста при температуре 36°C в анаэробных условиях образует колонии диаметром от 1,0 мм до 0,5 мм, круглые с ровными краями, беловатого цвета, поверхность гладкая выпуклая, блестящая.

Физиолого-биохимические признаки.

Гетеротрофный облигатный анаэроб, желатину не разжижает, мясо-пептонный агар (по уколу) разрывает выделяющимися газами брожения.

Отношение к источникам углерода.

Сбраживает: крахмал, сахарозу, глюкозу, фруктозу, мальтозу, маннит, галактозу, гликоген, рамнозу, декстрин, целлобиозу.

Не сбраживает: ксилозу, раффинозу, дульцит, целит.

Отношение к источникам азота.

Усваивает азот в форме солей аммония (серноокислый и фосфорноокислый).

Отношение к источникам фосфора.

Усваивает в форме фосфорнокислого аммония и суперфосфата.

Требует присутствия углекислого кальция для поддержания оптимальных значений pH среды в процессе роста.

Потребность в факторах роста.

Необходимым фактором является биотин. Потребность его удовлетворяется поступлением с мелассой.

Отношение к температуре.

Растет при температуре от 30 до 37°C, оптимальная температура 36°C.

Отношение к pH среды.

Растет на средах с pH от 5,8 до 7,0, оптимальное значение pH 6,0-6,5. Величина  $\text{H}_2$  в процессе роста имеет отрицательное значение в пределах от -4,8-6,3.

Штамм хранится в виде спор, заготовленных на жидкой картофельно-глюкозной среде. В запаянных стеклянных пробирках при температуре от +4 °C до комнатных условий. Срок хранения не ограничен. Может храниться также в виде лиофильно-высушенных спор в запаянных пробирках.

Пример 1. Получение н-бутанола и ацетона с использованием нового штамма-продуцента осуществляют следующим образом:

Штамм *C. acetobutylicum* S 3716, хранящийся в виде спор в запаянных стеклянных пробирках пастеризуют в кипящей воде 1 мин.

Затем суспензию спор помещают для оживления на картофельно-глюкозную среду.

Питательная среда для оживления имеет следующее соотношение компонентов, мас. картофель 25,0 (250 г/л), глюкоза  $5 \cdot 10^{-1}$  (5 г/л),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $1,5 \cdot 10^{-2}$  (1,5 г/л),  $\text{CaCO}_3$   $2,0 \cdot 10^{-2}$  (2,0 г/л), pH среды 6,2.

Приготовленную питательную среду в количестве 0,5 л помещают в бродильную емкость объемом 1 л и стерилизуют при 120 °C в течение 40 мин и охлаждают до температуры 36°C. Туда же (с соблюдением правил асептики) вносят посевной материал

(суспензию спор нового штамма) в количестве 0,01 л (или 2% от объема сбраживаемой среды) и процесс брожения ведут при температуре 36°C в течение 18-20 ч до получения культуры в экспоненциальной фазе роста.

Затем вегетативным посевным материалом засевают ферментационную среду следующего состава, мас. свеклосахарная меласса (по содержанию сахарозы и редуцирующих веществ) 5,5 (55 г/л),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $1,0 \cdot 10^{-2}$  (0,6 г/л),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$   $1,6 \cdot 10^{-2}$  (1,6 г/л),  $\text{CaCO}_3$  1,0 (10 г/л), pH среды 6,2.

Приготовленную ферментационную среду в количестве 8 л помещают в аппарат для анаэробного сбраживания объемом 10 л и стерилизуют при 0,8 атм в течение 20 мин, затем сразу охлаждают до температуры 36 °C. После этого туда же вносят (с соблюдением правил асептики) вегетативный посевной материал нового штамма в количестве 0,5 л (или 6% от объема сбраживаемой среды) и процесс брожения ведут при температуре 36°C в течение 36-40 ч до окончания процесса брожения.

В культуральной жидкости определяют содержание н-бутанола и ацетона методом газовой хроматографии и величину несброженных сахаров, кроме того, в процессе брожения фиксируют (газоанализатором) количество образующихся газов брожения.

На выходе общее содержание растворителей в культуральной жидкости составляет 22 г/л, в том числе н-бутилового спирта 15,5 г/л (или 70,45%) и ацетона 6,5 г/л (или 29,55%). При этом выделяется 29,8 г/л газов брожения, в том числе:  $\text{CO}_2$  66%  $\text{H}_2$  34%. Конверсия введенных в среду сахаров в образовавшиеся н-бутанол и ацетон достигает 40% что составляет 93% от теоретически возможного выхода.

Таким образом, штамм *C. acetobutylicum* S-3716 синтезирует н-бутанола в 1,4 раза, а ацетона в 1,9 раза (или на 20% от общей суммы растворителей) больше, чем штамм-прототип и позволяет получить выход белизны к теоретически возможному.

Литература

1. Логоткин И.С. Технология ацетон-бутилового производства. Пищепромиздат. 1958.

2. Промышленный регламент на производство растворителей: ацетона, бутанола и этанола способом брожения. ПР 64-35-89, г. Ефремов, 1989.

3. Monot Frederic, Engasser Jean-Mare, Petitdemage Henri. "Regulation of acetonobutanol production in batch and continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*" "Biotechnol and Bioeng. Symp.", 1983 N 13, p. 207-216.

4. Лукина Г.П. Грачева Л.Н. и др. Сбраживание свеклосахарной мелассы культурой *C. acetobutylicum* при получении растворителей. Микробиологическая промышленность, 1980, N 3, с. 17-18.

5. Любимова И.К. Великая М.А. и др. Биосинтез растворителей мутантами *C. acetobutylicum*, устойчивыми к 2-дезоксид-Д-глюкозе. Биотехнология, 1993, N 8, с. 10-12.

6. Корнеева О.С. Жеребцов Н.А. и др.

Роль амилалитических ферментов Clostridium acetobutylicum в биосинтезе растворителей. Биотехнология, 1986, N 3, с. 133-136.

7. Абилев С.К. Любимова И.К. и др. Мутанты анаэробного продуцента Clostridium acetobutylicum, устойчивые к антибиотикам. Биотехнология, 1990, N 4, с. 16-17

8. Авторское свидетельство СССР N 1604852. Способ сбраживания крахмалсодержащей среды для получения ацетона, бутанола и этанола. 1990, с. 12 р 7/00, 7/06.

9. Патент США N 4521516, 1982, МКИ: С 12 N 1/20,

10. Патент США N 4757010, 1988, МКИ: С 12 N 1/20 С 12 Н 7/28.

11. Патент США N 456843, 1986, МКИ: С 12

Р 7/16

12. Lemmel S.A. Mutagenesis in Clostridium acetobutylicum. Biotechnol. Lett. 1985, 7 N 10, p. 711-716.

5 13. Патент США N 4649112, 1987, МКИ: С 12 Р 7/40, 7/28,

14. Заявка Франции N 2559160, 1985, МКИ: С 12 Р 7/06.

10 15. Лукина Г.П. Ежова И.Е. Гуськова Н.П. Способ повышения выхода н-бутилового спирта в ацетонобутиловом производстве. Микробиологическая промышленность, 1983. N 6, с. 37-38.

#### Формула изобретения:

15 Штамм бактерий Clostridium acetobutylicum ВКПМ В-5359 продуцент н-бутилового спирта и ацетона.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

RU 2080382 C1

| Штамм  | Продуктивность, г/л |        |        |       | Конверсия углеводов, % |
|--------|---------------------|--------|--------|-------|------------------------|
|        | н-бутанол           | ацетон | этанол | Сумма |                        |
| S      | 11,07               | 3,38   | 0,6    | 15,07 | 34,0                   |
| S-3716 | 15,50               | 6,50   | -      | 22,00 | 40,0                   |

RU 2080382 C1