



(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 7/16 (2006.01)
C12R 1/145 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2011105882/10**, **17.02.2011**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.02.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **17.02.2011**

(45) Опубликовано: **10.08.2012** Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **БЕРЕЗИНА О.В. и др. Внеклеточная гликозилгидролазная активность клостридий, образующих ацетон, бутанол и этанол. // Прикладная биохимия и микробиология, 2008, т.44, №1, с.49-55. RU 2393213 C1, 27.06.2010. RU 2381270 C1, 10.02.2010. RU 2080382 C1, 27.05.1997. US 4757010 A, 12.07.1988.**

Адрес для переписки:

**117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, 1,
 ФГУП "ГосНИИгенетика"**

(72) Автор(ы):

**Сушкова Валентина Ивановна (RU),
 Яроцкий Сергей Викторович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное унитарное предприятие "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов" (ФГУП "ГосНИИгенетика") (RU)

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM - ПРОДУЦЕНТ Н-БУТАНОЛА

(57) Реферат:

Штамм бактерий *Clostridium acetobutylicum* ВКПМ В-10289 получен путем облучения ультрафиолетом суспензии бактерий штамма *Clostridium acetobutylicum* №6 и последующей селекцией в анаэробных

стационарных условиях. При различных условиях ферментации штамм характеризуется повышенным уровнем биосинтеза н-бутанола. Выход н-бутанола составляет 8,3-14 г/л. 2 табл., 6 пр.

RU 2 4 5 8 1 1 8 C 1

RU 2 4 5 8 1 1 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 7/16 (2006.01)
C12R 1/145 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011105882/10, 17.02.2011**

(24) Effective date for property rights:
17.02.2011

Priority:

(22) Date of filing: **17.02.2011**

(45) Date of publication: **10.08.2012 Bull. 22**

Mail address:

**117545, Moskva, 1-j Dorozhnyj pr-d, 1, FGUP
"GosNIIgenetika"**

(72) Inventor(s):

**Sushkova Valentina Ivanovna (RU),
Jarotskij Sergej Viktorovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe
predpriyatie "Gosudarstvennyj nauchno-
issledovatel'skij institut genetiki i selektsii
promyshlennykh mikroorganizmov" (FGUP
"GosNIIgenetika") (RU)**

(54) CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM STRAIN - N-BUTANOL PRODUCER

(57) Abstract:

FIELD: agriculture.

SUBSTANCE: Clostridium acetobutylicum strain, the Russian National Collection of Industrial Microorganisms B-10289 is produced by the exposure to UV radiation of a bacterial suspension of the Clostridium acetobutylicum strain, No. 6 that is

followed by the anaerobic steady-state selection. The n-butanol yield makes 8.3-14 g/l.

EFFECT: in the various fermentation environments, the strain is characterised by a higher level of n-butanol biosynthesis.

2 tbl, 6 ex

RU 2 4 5 8 1 1 8 C 1

RU 2 4 5 8 1 1 8 C 1

Изобретение относится к микробиологической промышленности, в частности к получению штамма - продуцента н-бутанола, используемого в качестве органического растворителя, биотоплива и основы для синтеза многих промышленно ценных органических соединений.

Известен штамм ВКПМ В-4786, который на субстрате из 6% ржаной муки синтезирует до 7,9 г/л н-бутанола [1].

Ближайшим аналогом заявляемого штамма является штамм *Clostridium acetobutylicum* №6, который на питательном субстрате из 6% ржаной муки синтезирует до 8,3 г/л н-бутанола [1].

Задача заявляемого изобретения - получить штамм бактерий *Clostridium acetobutylicum* с повышенным уровнем биосинтеза н-бутанола.

Задача решена путем получения штамма *Clostridium acetobutylicum* СВ 6-1, депонированного во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) как *Clostridium acetobutylicum* ВКПМ В-10289.

Заявляемый штамм получен путем облучения ультрафиолетом суспензии бактерий штамма *Clostridium acetobutylicum* №6 и последующей селекции в анаэробных стационарных условиях и обладает следующими характеристиками.

Культурально-морфологические признаки

Через 4 суток роста в анаэробных условиях на агаризованной среде SOL (мас.%): K_2HPO_4 - 0,07; K_2HPO_4 - 0,07; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,002; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0015; NaCl - 0,001; ацетат аммония - 0,3; дрожжевой экстракт - 0,1; пептон - 0,1; цистеин - 0,05; крахмал - 0,1; глюкоза 1; витаминный раствор - 1 мг/л; резазурин - 1 мг/л; вода - остальное; колонии имеют белый центр и ореол с ровными краями. Штрих на анаэробном агаре: поверхность ровная, края ровные.

Клетки в виде одиночных вытянутых палочек.

Физиологические признаки

Сбраживает сахара: гексозы (глюкозу, галактозу, маннозу, фруктозу), пентозы (ксилозу, арабинозу), дисахара (лактозу, сахарозу, мальтозу), олигосахара, крахмал и др.; в качестве источника азота использует пептон и аммонийный.

Штамм *Clostridium acetobutylicum* ВКПМ В-10289 синтезирует н-бутанол в количестве до 14 г/л на субстратах, содержащих ржаную муку. Устойчив к содержанию в питательном субстрате до 20 мас.% культуральных жидкостей после маслянокислого брожения штаммов *Clostridium tyrobutyricum* ВКПМ В-10406 или *Clostridium butyricum* ВКПМ В-9619.

Условия хранения

Штамм *Clostridium acetobutylicum* ВКПМ В-10289 хранят в лаборатории №12 ФГУП «ГосНИИгенетика» (адрес: 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1) в споровом состоянии на среде следующего состава (мас.%): ржаная мука обдирная - 3; вода - остальное, или на среде MSS (мас.%): K_2HPO_4 - 0,1; K_2HPO_4 - 0,08; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,005; ацетат аммония - 0,3; дрожжевой экстракт - 0,5; цистеин-HCl - 0,05; дрожжевой экстракт - 0,5; пара-аминобензойная кислота - 0,001; глюкоза - 2; вода - остальное.

Пересев осуществляют через полгода на один из питательных субстратов, указанных выше, термостатируют при $t=37^\circ\text{C}$ в течение 2-3 суток. Полученную суспензию бактерий хранят при $t=4-6^\circ\text{C}$.

Во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов штамм *Clostridium acetobutylicum* ВКПМ В-10289 хранят в лиофилизированном виде.

Пример 1. Биосинтез н-бутанола заявляемым штаммом на 6% водной суспензии

ржаной муки

Брожение проводят в лабораторных, статических, строго анаэробных условиях во флаконах общим объемом 120 см³ и рабочим объемом 50 см³, доза посевного материала 5 об.%.
5

Условия ферментации: рН 4,0-6,3, температура 37°C, 48 ч. Характеристика используемого питательного субстрата: 6% водная суспензия ржаной муки с содержанием крахмала 39 г/л.

В качестве контроля используют родительский штамм *Clostridium acetobutylicum* №6, который является также ближайшим аналогом. Время его ферментации 72 ч.
10

Определение количества н-бутанола и других компонентов культуральной жидкости во всех примерах осуществляют методом газохроматографического анализа.

Из результатов, приведенных в таблице 1, следует, что на субстрате, представляющем собой 6% водную суспензию ржаной муки, заявляемый штамм превосходит ближайший аналог как по уровню биосинтеза н-бутанола (9,1 г/л вместо (8,3 г/л)), так и ряду других приведенных в таблице показателей.
15

Пример 2. Биосинтез н-бутанола заявляемым штаммом на 6% водной суспензии ржаной муки с добавкой мелассы в количестве 0,5% по сахарозе

Условия ферментации и контроль, как в примере 1, время ферментации 48 ч для заявляемого штамма и 48 ч - для контроля.
20

Характеристика используемого питательного субстрата: 6% водная суспензия ржаной муки с добавкой мелассы в количестве 0,5% по сахарозе (содержание условного крахмала 43,75 г/л).
25

Из результатов, приведенных в таблице 1, следует, что на субстрате, представляющем собой 6% водную суспензию ржаной муки с добавкой мелассы в количестве 0,5% по сахарозе заявляемый штамм превосходит ближайший аналог как по уровню биосинтеза н-бутанола (8,6 г/л вместо 8,3 г/л), так и ряду других приведенных в таблице показателей.
30

Пример 3. Биосинтез н-бутанола заявляемым штаммом на 6% водной суспензии ржаной муки с добавкой мелассы в количестве 1,35% РВИ

Условия ферментации и контроль, как в примере 1, но время ферментации для заявляемого штамма 72 ч, а для контроля - 96 ч.
35

Характеристика используемого питательного субстрата: 6% суспензия ржаной муки с добавкой мелассы в количестве 1,35% по редуцирующим веществам после инверсии - РВИ (содержание условного крахмала 51,8 г/л).

Из результатов, приведенных в таблице 1, следует, что на субстрате, представляющем собой 6% водную суспензию ржаной муки с добавкой мелассы в количестве 1,35% РВИ, заявляемый штамм превосходит ближайший аналог как по уровню биосинтеза н-бутанола (14,0 г/л вместо 9,1 г/л), так и ряду других приведенных в таблице показателей.
40

45

50

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

Таблица 1

Состав среды	Номер штамма	Состав продуктов брожения, г/л							Время, ч	Выход от крахмала, %		исходного ристелей
		буга-нол	ацетон	этанола	сумма раствори-телей	кислоты		бута-нола		раство-		
						масля-ная	уксус-ная					
6% суспензия ржаной муки	ВКПМ В-10289 (заявляемый)	9,1	5,1	1,6	15,8	1,0	0,6	23,3	40,5			
	№6 (контрольный)	8,3	4,0	0,7	13,0	1,0	1,1	21,2	33,3			
6% суспензия ржаной муки с добавкой мелассы	ВКПМ В-10289 (заявляемый)	8,6	4,5	1,4	14,5	0,8	0,7	19,7	33,1			
	№6 (контрольный)	8,3	4,6	0,6	13,5	0,9	1,2	18,9	30,9			
6% суспензия ржаной муки с добавкой 1,35% РВИ мелассы	ВКПМ В-10289 (заявляемый)	14,0	7,4	1,5	22,9	0,0	0,0	27,0	44,2			
	№6 (контрольный)	9,1	4,0	2,3	15,4	1,15	1,33	17,6	29,7			
7% суспензия ржаной муки с добавкой 1,35% РВИ мелассы	ВКПМ В-10289 (заявляемый)	13,5	6,1	3,0	22,6	2,0	2,4	23,2	38,8			
	№6 (контрольный)	12,3	4,9	2,0	19,2	1,6	1,1	21,1	32,9			

Пример 4. Биосинтез н-бутанола заявляемым штаммом на 7% водной суспензии ржаной муки с добавкой мелассы в количестве 1,35% РВИ

Условия ферментации и контроль, как в примере 1, но для контроля время 54 ч.

Характеристика используемого питательного субстрата: 7% суспензия ржаной муки с добавкой мелассы в количестве 1,35% по РВИ (содержание условного крахмала 58,3 г/л).

5 Из результатов, приведенных в таблице 1, следует, что на субстрате, представляющем собой 7% водную суспензию ржаной муки с добавкой мелассы в количестве 1,35% РВИ, заявляемый штамм превосходит ближайший аналог как по уровню биосинтеза н-бутанола (13,5 г/л вместо 12,3 г/л), так и ряду других
10 приведенных в таблице показателей.

Пример 5. Биосинтез н-бутанола заявляемым штаммом на ржаной муке с добавлением культуральной жидкости штамма *Clostridium tyrobutyricum* ВКПМ В-10406

15 Подготавливают посевной материал штамма *Clostridium tyrobutyricum* ВКПМ-10406. Для этого используют питательный субстрат следующего состава (мас.%): K_2HPO_4 - 0,07; K_2HPO_4 - 0,07; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,002; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0015; NaCl - 0,001; ацетат аммония - 0,3; дрожжевой экстракт - 0,1; пептон - 0,1; цистеин - 0,05; витаминный раствор - 1 мл/л; вода - остальное. Содержание
20 моносахаридов 2%. В качестве источников моносахаридов используют ферментативный гидролизат растительного сырья (кукурузная кочерыжка и др.) с добавками инвертированной мелассы в количестве 1% по сахарозе (мелассу применяют как источник биотина). Питательный субстрат стерилизуют при $t=125^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. Выращивание ведут в течение 7 суток.

25 Полученный посевной материал в количестве 10 об.% засевают в биореактор, содержащий питательный субстрат выше указанного состава с концентрацией РВ=2 мас.% и проводят процесс маслянокислого брожения в течение 10 суток.

30 При приготовлении посевного материала и проведении маслянокислого брожения используют следующий технологический режим: $t=37^\circ\text{C}$, рН 5,2-6,5. рН среды регулируют предпочтительно 25% раствором аммиачной воды.

Выросшую бактериальную биомассу отделяют центрифугированием или сепарированием (5-10 об/мин). Фугат используют при приготовлении питательного субстрата для процесса ацетонобутанольного брожения в количестве 20 мас.%.

35 Для ацетонобутанольного брожения используют штамм *Clostridium acetobutylicum* ВКПМ В-10289 (СВ 6-1). Для получения посевного материала культуру засевают в количестве 5 об.% по отношению к объему субстрата. Субстрат стерилизуют при температуре 135°C в течение 1 ч. Брожение проводят в течение 48 ч.

40 Полученный посевной материал в количестве 3 об.% засевают в биореактор со стерильным питательным субстратом. Состав субстрата (мас.%): ржаная мука - 6, меласса - 0,5 по сахарозе, культуральная жидкость после маслянокислого брожения со штаммом *Clostridium tyrobutyricum* ВКПМ-10406 - 20, вода - остальное (условный крахмал в субстрате 4,375 мас.%). Время брожения составляет 48 ч.

45 При приготовлении посевного материала и проведении ацетонобутанольного брожения используют следующий технологический режим: $t=37^\circ\text{C}$, рН 4,0-6,3. рН среды регулируют предпочтительно 25% раствором аммиачной воды.

50 Из результатов, приведенных в таблице 2, следует, что в предлагаемых условиях заявляемый штамм превосходит ближайший аналог по уровню биосинтеза н-бутанола (8,9 г/л вместо 4,4 г/л), а также ряду других приведенных в таблице 2 показателей.

Пример 6. Биосинтез н-бутанола заявляемым штаммом на ржаной муке с

добавлением культуральной жидкости штамма *Clostridium butyricum* ВКПМ В-9619

Технологическая схема, субстраты и условия ферментации аналогичны описанным в примере 5. Для проведения процесса ацетонобутанольного брожения используют питательный субстрат с добавкой культуральной жидкости штамма *Clostridium butyricum* ВКПМ В-9619 в количестве 20 мас.%. Для ацетонобутанольного брожения используют штамм *Clostridium acetobutylicum* ВКПМ В-10289.

Из результатов, приведенных в таблице 2, следует, что в предлагаемых условиях заявляемый штамм превосходит ближайший аналог по уровню биосинтеза н-бутанола (9,9 г/л вместо 0,15 г/л), а также ряду других приведенных в таблице 2 показателей.

Таблица 2

Наименование штамма	Время, ч	Химический состав отработанной культуральной жидкости, г/л					Выход от исходного крахмала, %	
		бута-нол	ацетон	этанол	кислоты		бута-нола	растворителей
					масляная	уксусная		
С добавками культуральной жидкости <i>Cl. tyrobutyricum</i> ВКПМ-10406								
<u>ВКПМ В-10289</u> (заявляемый)	48	8,9	4,6	1,0	1,12	1,22	20,3	33,1
№6 (контрольный)	48	4,4	2,7	0,3	2,16	1,82	10,0	16,9
С добавками культуральной жидкости <i>Cl. butyricum</i> ВКПМ В-9619								
<u>ВКПМ В-10289</u> (заявляемый)	24	3,53	1,77	0,20	2,13	1,93	-	-
	48	9,90	5,19	0,72	1,39	1,67	22,6	36,1
№6 (контрольный)	48	0,15	0,04	0,03	0,95	0,83	0,3	0,5

Таким образом, заявляемый штамм *Clostridium acetobutylicum* ВКПМ В-10289 во всех предложенных условиях ферментации превосходит ближайший аналог по уровню биосинтеза н-бутанола, а срок его ферментации либо короче, либо соответствует таковому у ближайшего аналога.

Источники информации

1. Березина О.В., Синеокий С.П., Великодворская Г.А. и др. Внеклеточная гликозилгидролазная активность клостридий, образующих ацетон, бутанол и этанол // Прикладная биохимия и микробиология. - 2008. - Т.44. - №1.

Формула изобретения

Штамм бактерий *Clostridium acetobutylicum* СВ 6-1, ВКПМ В-10289 - продуцент н-бутанола.