



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008149763/13, 17.12.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.12.2008

(45) Опубликовано: 27.06.2010 Бюл. № 18

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2080382 C1, 27.05.1997. RU 2091483 C1,
27.09.1997. SU 1604852 A1, 07.11.1990.

Адрес для переписки:

111033, Москва, ул. Самокатная, 4-Б, ГНУ
ВНИИПБТ Россельхозакадемии, Н.А.
Сабуровой

(72) Автор(ы):

Поляков Виктор Антонович (RU),
Римарева Любовь Вячеславовна (RU),
Галкина Галина Васильевна (RU),
Илларионова Валентина Ивановна (RU),
Куксова Елена Владимировна (RU),
Горбатова Елена Владимировна (RU),
Волкова Галина Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное научное учреждение
"Всероссийский научно-исследовательский
институт пищевой биотехнологии
Российской академии сельскохозяйственных
наук" (RU)

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

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для синтеза н-бутилового спирта, ацетона и этанола, а также производства растворителей.

Штамм *Clostridium acetobutylicum* ВКМ В-2512D депонирован во Всероссийской коллекции

микроорганизмов ИБФМ РАН и является продуцентом н-бутилового спирта, ацетона и этанола. Изобретение позволяет повысить выход н-бутилового спирта, ацетона и этанола и расширить сырьевую базу для их получения.
1 табл.

RU 2 393 213 C1

RU 2 393 213 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 393 213** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 7/00 (2006.01)

C12R 1/145 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2008149763/13, 17.12.2008

(24) Effective date for property rights:
17.12.2008

(45) Date of publication: 27.06.2010 Bull. 18

Mail address:

111033, Moskva, ul. Samokatnaja, 4-B, GNU
VNIIPBT Rossel'khozakademii, N.A. Saburovoj

(72) Inventor(s):

Poljakov Viktor Antonovich (RU),
Rimareva Ljubov' Vjacheslavovna (RU),
Galkina Galina Vasil'evna (RU),
Illarionova Valentina Ivanovna (RU),
Kuksova Elena Vladimirovna (RU),
Gorbatova Elena Vladimirovna (RU),
Volkova Galina Sergeevna (RU)

(73) Proprietor(s):

Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie
"Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij
institut pishchevoj biotekhnologii Rossijskoj
akademii sel'skokhozjajstvennykh nauk" (RU)

(54) **CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM BACTERIA STRAIN - PRODUCER OF N-BUTYL ALCOHOL, ACETONE AND ETHANOL**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry; biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and can be used for synthesis of n-butyl alcohol, acetone and ethanol, as well as production of solvents. The Clostridium acetobutylicum VKM B-2512D strain is deposited in the Russian collection of microorganisms of the Institute of Biochemistry

and Microbial physiology of the Russian Academy of Sciences and is a producer of n-butyl alcohol, acetone and ethanol.

EFFECT: invention increases output of n-butyl alcohol, acetone and ethanol and widens the raw material base for their production.

1 tbl, 1 ex

RU 2 393 213 C1

RU 2 393 213 C1

Настоящее изобретение относится к микробиологической промышленности и касается получения нового штамма *Clostridium acetobutylicum*, продуцирующего н-бутиловый спирт, ацетон и этанол.

Н-бутиловый спирт (н-бутанол), ацетон и этанол применяются во 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.

Н-бутанол, ацетон и этанол могут быть получены и химическим способом, однако качество их, получаемых на заводах синтетического каучука, невысокое из-за значительного содержания в них непредельных соединений. В связи с этим такие спирты не находят применения в ряде отраслей промышленности, например в лакокрасочной и фармацевтической и др., потребность которых в высококачественном н-бутиловом спирте покрывается н-бутанолом, полученным способом микробиологического синтеза.

Н-бутиловый спирт, получаемый брожением, представляет собой первичный бутиловый спирт ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$).

Известно, что бактерии *Clostridium acetobutylicum* при сбраживании различных углеводов синтезируют одновременно три целевых продукта: н-бутиловый спирт, ацетон и этанол, получившие общее название органические растворители, процентное соотношение которых колеблется в пределах 60:30:10. 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 н-бутиловый спирт.

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

Известен штамм *Clostridium acetobutylicum*, который за 66 часов брожения на мучных средах накапливает в культуральной жидкости $13,5\text{-}15,5\text{ г/дм}^3$ органических растворителей, в том числе н-бутилового спирта $9,0\text{-}10,0\text{ г/дм}^3$, ацетона $3,5\text{-}4,0\text{ г/дм}^3$ и этанола $1,0\text{-}1,5\text{ г/дм}^3$ (Промышленный регламент на производство растворителей: ацетона, бутанола и этанола способом брожения. ПР64-35-89, г.Ефремов, 1989) /1/.

Имеются сообщения о штаммах мутантах *Clostridium acetobutylicum*, накапливающих на мучных средах за 66 часов брожения $9,0\text{-}10,0\text{ г/дм}^3$ н-бутанола, $4,3\text{-}4,9\text{ г/дм}^3$ ацетона и $1,3\text{-}1,9\text{ г/дм}^3$ этанола (Любимова И.К., Великая М.А. и др. Биосинтез растворителей мутантами *C. acetobutylicum*, устойчивыми к 2-дезоксид-глюкозе - «Биотехнология», 1993, №8, сс.10-12) /2/.

Наиболее близким к настоящему изобретению является штамм *Clostridium acetobutylicum* VKPM-B-4786 (Березина О.В., Синеокий С.П. и др. Внеклеточная гликозилгидролазная активность клостридий, образующих ацетон, бутанол и этанол - «Прикладная биохимия и микробиология», 2008, т.44, с.49-55) /3/.

Недостатком данного известного штамма является недостаточно высокий выход растворителей от используемого углеводного субстрата.

Техническим результатом, достигаемым настоящим изобретением, является повышение общего выхода растворителей, в частности н-бутанола.

Указанный технический результат достигается тем, что в качестве продуцента н-бутилового спирта, ацетона и этанола используют вновь выделенный

штамм *Clostridium acetobutylicum* ВКМ В-2512D.

Штамм выделен из растительных остатков силосной ямы и охарактеризован по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам.

Морфология клеток

Клетки бактерий палочковидные, попарно или в коротких цепочках. В процессе развития образует длинные цепочки, которые в дальнейшем распадаются на отдельные клетки.

Размер молодых вегетативных клеток:

d 0,6-0,7 мкм, l 3-5 мкм.

Имеет одну субтерминальную овальную спору, неподвижны, окрашиваются по Грамму положительно.

Культурально-морфологические признаки.

На картофельной среде с глюкозой и агаром через 48 часов роста при 37°C в анаэробных условиях образует круглые с ровными краями колонии диаметром 0,8-1,0 мкм. Структура колоний однородная, серовато-белого цвета, непрозрачные, поверхность гладкая, выпуклая, жирно-блестящая.

Физиолого-биохимические признаки

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

Сбраживает: крахмал, глюкозу, целлобиозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, манозу, сахарозу, глицерин и пируват.

Усваивает азот в форме солей аммония и суперфосфата.

Требуется присутствие углекислого кальция для поддержания оптимальных значений pH среды в процессе роста.

Необходимым фактором роста являются биотин и p-аминобензойная кислота.

Растет при температуре от 15 до 45°C, оптимальная температура 37°C.

Растет на средах с pH 4,0-8,0, оптимальное значение pH 5,5-6,0.

В анаэробных условиях при культивировании на мучных средах образует н-бутиловый спирт, ацетон, этанол и выделяет газы.

Штамм хранится в лиофильно-высушенном виде в запаянных стеклянных пробирках при температуре от +4°C до комнатных условий. Срок хранения не ограничен.

На основании проведенного изучения культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков культура определена как *Clostridium acetobutylicum* (по Определителю бактерий Берджи. Москва. Мир, 1997). Культура депонирована во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН под номером ВКМ В-2512D.

Штамм *Clostridium acetobutylicum* ВКМ В-2512D не является генетически модифицированным штаммом.

Штамм *Clostridium acetobutylicum* ВКМ В-2512D относится к микроорганизмам, не патогенным для человека, согласно классификации микроорганизмов, приведенной в Санитарных правилах СП 1.2.731-99. Работа со штаммом *Clostridium acetobutylicum* ВКМ В-2512D не требует специальных мер предосторожности.

Ниже приводится пример реализации изобретения.

Пример 1

Получение н-бутанола, ацетона и этанола с использованием нового штамма продуцента осуществляют следующим образом.

Клетки штамма *Clostridium acetobutylicum* ВКМ В-2512D, хранящиеся в лиофильно-высушенном состоянии в запаянных пробирках, подвергаются оживлению.

Питательная среда для оживления имеет следующий состав, г/дм³: КН₂РO₄ - 0,7; К₂НРO₄ - 0,7; MgSO₄·7H₂O - 0,1; MnSO₄·4H₂O - 0,02; FeSO₄·7H₂O - 0,015; NaCl - 0,01; глюкоза - 20,0; аммонийный ацетат - 3,0; дрожжевой экстракт - 1,0; пептон - 1,0; цистеин - 0,5; агар - 15,0; р-аминобензойная кислота - 0,001; тиамин - 0,001; биотин - 1,0 мкг; крахмал - 1,0; вода дистиллированная - 1 дм³. Температура 37°C, анаэробные условия, продолжительность роста 24 часа.

Приготовленные таким образом клетки переносят в стерильную питательную среду, содержащую в г/дм³: пшеничная мука - 40,0; углекислый кальций - 2,0; водопроводная вода - 1 дм³. Процесс брожения ведут анаэробно при температуре 37°C в течение 20 часов до получения культуры, клетки которой находятся в экспоненциальной фазе роста.

Затем вегетативным посевным материалом засевают стерильную ферментационную среду следующего состава г/дм³: пшеничная мука - 80,0; углекислый кальций - 2,0; водопроводная вода - 1 дм³. Количество посевного материала 20% от объема питательной среды. Культивирование ведут при температуре 37°C анаэробно в течение 72 часов до окончания процесса брожения.

На выходе общее содержание растворителей в культуральной жидкости составляет 30,0 г/дм³, в том числе 23,0 г/дм³ н-бутанола, 4,0 г/дм³ ацетона и 3,0 г/дм³ этанола. Конверсия углеводов крахмала в образовавшиеся растворители составляет 55,5%. Таким образом, штамм *Clostridium acetobutylicum* ВКМ В-2512D синтезирует н-бутанола в 6,22 раза, ацетона в 2,22 раза и этанола в 6 раз больше, чем штамм прототип *Clostridium acetobutylicum* VKPM-B-4786, и позволяет считать его перспективным для получения н-бутанола, ацетона и этанола в промышленных масштабах (таблица).

Сравнительные результаты выхода н-бутанола, ацетона и этанола заявленным штаммом и прототипом				
Штамм <i>Clostridium acetobutylicum</i>	Продуктивность, г/дм ³			
	н-бутанол	ацетон	этанол	сумма
VKPM-B-4786	3,7	1,8	0,5	6,0
ВКМ В-2512D	23,0	4,0	3,0	30,0

Формула изобретения

Штамм бактерий *Clostridium acetobutylicum* ВКМ В-2512D - продуцент н-бутилового спирта, ацетона и этанола.