



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2016150491, 21.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.12.2016

Дата регистрации:
15.09.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.12.2016

(45) Опубликовано: 15.09.2017 Бюл. № 26

Адрес для переписки:

119991, Москва, Ленинский просп., 65, корп. 1,
РГУ нефти и газа (НИУ) имени И.М. Губкина,
отдел защиты интеллектуальной собственности

(72) Автор(ы):

Кожевникова Елена Юрьевна (RU),
Барков Артём Вадимович (RU),
Спицына Елена Александровна (RU),
Петрова Дарья Андреевна (RU),
Новиков Андрей Александрович (RU),
Котелев Михаил Сергеевич (RU),
Гущин Павел Александрович (RU),
Иванов Евгений Владимирович (RU),
Винокуров Владимир Арнольдович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Российский государственный
университет нефти и газа (национальный
исследовательский университет) имени И.М.
Губкина" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: КОЖЕВНИКОВА Е.Ю.
Разработка технологических основ
получения биоэтанола с использованием
базидиальных грибов // Автореферат канд.
хим. наук, М., 07.10.2016. JP 2010183859 A,
22.10.2014. WO 2010/044603 A1, 22.04.2010. US
2014/0154763 A1, 05.06.2014.

(54) ШТАММ БАЗИДИОМИЦЕТА TRAMETES HIRSUTA - ПРОДУЦЕНТ ЭТИЛОВОГО СПИРТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии.
Штамм базидиального гриба *Trametes hirsute*,
обладающий способностью продуцировать
этиловый спирт, депонирован во Всероссийской
Коллекции Промышленных Микроорганизмов

под регистрационным номером ВКПМ F-1287.
Штамм *Trametes hirsute* ВКПМ F-1287 позволяет
получать биоэтанол с высоким выходом, не
содержащим такие примеси, как ацетон и
изопропанол. 1 табл., 5 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2016150491, 21.12.2016**(24) Effective date for property rights:
21.12.2016Registration date:
15.09.2017

Priority:

(22) Date of filing: **21.12.2016**(45) Date of publication: **15.09.2017** Bull. № 26

Mail address:

119991, Moskva, Leninskij prosp., 65, korp. 1, RGU
nefti i gaza (NIU) imeni I.M. Gubkina, otdel
zashchity intellektualnoj sobstvennosti

(72) Inventor(s):

**Kozhevnikova Elena Yurevna (RU),
Barkov Artem Vadimovich (RU),
Spitsyna Elena Aleksandrovna (RU),
Petrova Darya Andreevna (RU),
Novikov Andrej Aleksandrovich (RU),
Kotelev Mikhail Sergeevich (RU),
Gushchin Pavel Aleksandrovich (RU),
Ivanov Evgenij Vladimirovich (RU),
Vinokurov Vladimir Arnoldovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Rossijskij gosudarstvennyj
universitet nefti i gaza (natsionalnyj
issledovatel'skij universitet) imeni I.M. Gubkina"
(RU)**

(54) **TRAMETES HIRSUTA BASIDIOMYCETE STRAIN - ETHYL ALCOHOL PRODUCER**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: strain of the basidial fungus
Trametes hirsute, which has the ability to produce ethyl
alcohol, was deposited in the Russian National
Collection of Industrial Microorganisms under accession

number VKPM F-1287.

EFFECT: Trametes hirsute strain VKPM F-1287
allows to obtain bioethanol in high yield, which does
not contain impurities such as acetone and isopropanol.
1 tbl, 5 ex

R U 2 6 3 0 9 9 7 C 1

R U 2 6 3 0 9 9 7 C 1

Изобретение относится к биотехнологии и касается штамма базидиомицета *Trametes hirsuta*, продуцирующего этанол из глюкозы целлюлозного и лигноцеллюлозного сырья. Биоэтанол, получаемый с помощью базидиальных грибов, может быть использован в качестве компонента топлива для двигателей внутреннего сгорания, в медицине и

пищевой промышленности.

Известен штамм базидиомицета *Phlebia* sp. MKFC40001, способный продуцировать этиловый спирт из древесных опилок с выходом, достигающим 43,9% от теоретически возможного, за 20 суток инкубирования в полуанаэробных условиях. Недостатком указанного штамма является необходимость предобработки лигноцеллюлозного субстрата в аэробных условиях в течение 8 недель (US 9145568, 2015).

Также известен штамм *Phanerochaete chrysosporium*, продуцирующий этиловый спирт из лигноцеллюлозных субстратов (дробленое зерно, кукурузная солома) путем их твердофазного сбраживания в полуанаэробных условиях. Недостатком указанного штамма является способность продуцировать также и примеси - ацетон и изопропанол

(US 8309328, 2012).

Наиболее близким аналогом заявленного штамма является штамм *Trametes hirsuta*, способный продуцировать из углеводного сырья до 9,7 г/л этанола за 5 дней ферментации (JP 2012055307, 2012). При этом, однако, выход этилового спирта недостаточен. Кроме того, указанный штамм способен продуцировать спирт только из углеводного сырья, таким образом, спектр используемого сырья ограничен.

Техническая проблема заключается в получении нового эффективного штамма - продуцента этилового спирта из глюкозы, целлюлозного и лигноцеллюлозного сырья.

Указанная техническая проблема достигается созданием штамма базидиомицета *Trametes hirsuta* ВКПМ F-1287 - продуцента этилового спирта из глюкозы, целлюлозного и лигноцеллюлозного сырья.

Технический результат заключается в создании штамма, способного продуцировать этиловый спирт из расширенного спектра исходного сырья - глюкозы, целлюлозного и лигноцеллюлозного сырья (субстратов) с высоким выходом целевого продукта высокого качества, не содержащего такие примеси, как ацетон и изопропанол.

Новый штамм *Trametes hirsuta* выделен из природного плодового тела, найденного на мертвой древесине *Betula pendula*. Кусочки гриба, выделенные из стерильной части плодового тела, в асептических условиях были перенесены на плотную питательную среду (сусловый агар), содержащую 30 мг/л цефотаксима. Принадлежность выделенного штамма к чистой базидиальной культуре определили по наличию пряжек на мицелии.

Таксономическая принадлежность заявляемого штамма к виду *Trametes hirsuta* подтверждена молекулярно-генетическим методом. Штамм базидиального гриба *T. hirsuta* депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ГосНИИгенетика и имеет регистрационный номер ВКПМ F-1287.

Характеристики штамма *Trametes hirsuta*.

Выделенный штамм относится к классу Basidiomycetes, подклассу Agaricomycetidae, порядку Polyporales, семейству Polyporaceae, роду *Trametes*, виду *hirsuta*. Вид *T. hirsuta* не патогенен для человека и не образует токсичные метаболиты ни на одной из стадий морфогенеза.

Условия культивирования: сусловый агар, температура +26°C.

Условия хранения: в пробирках с сусловым агаром при +4°C в течение 12-18 месяцев без пересева.

Макроморфологические признаки: На сусловом агаре колония округлая с ризоидным краем, пушится вокруг инокулюма, профиль приподнятый. Воздушный мицелий белого

цвета, субстратный мицелий бесцветный. По мере старения мицелий становится плотным, кожистым.

Микроморфологические признаки:

Гифы воздушного мицелия до 4 мкм в диаметре, разветвленные, короткие. На мицелии имеются округлые медальонные пряжки стабильной формы.

Способностью продуцировать этиловый спирт обладает мицелий *T. hirsuta*, выращенный в условиях погруженного культивирования.

Вегетативный мицелий базидиомицета выращивают в погруженной культуре в асептических аэробных условиях. Культивирование осуществляют в качалочных колбах объемом 750 мл на орбитальной качалке при температуре 26°C. Среда для погруженного культивирования содержит: глюкозу - 20-30 г/л, соевую муку - 10-15 г/л, дигидрофосфат калия - 2,5-3,5 г/л, сульфат магния - 0,25-0,35 г/л и водопроводную воду. Значение pH среды доводят до 6,0-6,5. Питательную среду автоклавируют при температуре 121°C в течение 30 минут. Длительность процесса получения жидкого посевного мицелия составляет 4 суток, ферментации - 6 суток.

Штамм *T. hirsuta* способен сбраживать углеводы (в частности, глюкозу) и целлюлозные и лигноцеллюлозные субстраты (в частности, карбоксиметилцеллюлозы натриевую соль, микрокристаллическую целлюлозу, солому) в анаэробных условиях.

Ниже представлены примеры, иллюстрирующие изобретение, но не ограничивающие его.

Пример 1. Получение погруженного мицелия *T. hirsuta*.

Погруженное культивирование штамма *T. hirsuta* проводят на орбитальном шейкере со скоростью вращения 220 об/мин при температуре 26°C в качалочных колбах объемом 750 мл, содержащих 150 мл питательной среды следующего состава: глюкоза - 20 г/л, соевая мука - 10 г/л, дигидрофосфат калия - 2,5 г/л и сульфат магния - 0,25 г/л. Уровень pH среды доводят до 6,0-6,5. Процесс погруженного культивирования проводят в два этапа. На первом этапе получают жидкий посевной материал, на втором этапе осуществляют ферментацию.

Для приготовления посевного материала используют культуру, выращенную в пробирках на сусловом агаре. Кусочки агара размером не более 3×3 мм в количестве 10-15 штук асептически вносят в качалочные колбы, содержащие 150 мл питательной среды, и культивируют в течение 4 суток. Затем 15 мл посевного материала в асептических условиях вносят в качалочные колбы, содержащие 150 мл питательной среды, и культивируют в течение 6 суток. Выход воздушно-сухой биомассы составляет 9,1 г/л питательной среды на 6 сутки ферментации.

Пример 2. Получение погруженного мицелия *T. hirsuta*.

Получение погруженного мицелия *T. hirsuta* проводят, как описано в примере 1, но глюкозу, соевую муку, дигидрофосфат калия и сульфат магния в питательную среду вносят в количестве 30 г/л, 15 г/л, 3,5 г/л и 0,35 г/л соответственно. Выход воздушно-сухой биомассы составляет 7,8 г/л питательной среды на 6 сутки ферментации.

Пример 3. Получение погруженного мицелия *T. hirsuta*.

Получение погруженного мицелия *T. hirsuta* проводят, как описано в примере 1, но вместо глюкозы используют фруктозу. Выход воздушно-высушенной биомассы составляет 6,3 г/л питательной среды на 6 сутки культивирования.

Пример 4. Получение этилового спирта из глюкозы.

Получают погруженную культуру *T. hirsuta*, как аналогично примеру 1. Определяют остаточную концентрацию глюкозы в культуральной жидкости DNS-методом. В качалочные колбы с погруженной культурой асептически вносят стерильный раствор

глюкозы в концентрации 20 г/л. Колбы закрывают стерильными гидрозатворами и термостатируют при 25°C в темном месте. Отбор проб для определения концентрации этилового спирта и глюкозы в культуральной жидкости производится каждые 24 часа. Определение концентрации этилового спирта проводят методом газовой хроматографии.

- 5 Максимальная концентрация этилового спирта в культуральной жидкости составляет 12,4 г/л на 4 сутки сбраживания. Полученные данные по исследованию динамики накопления целевого продукта и убыли исходного субстрата с использованием описываемого штамма *Trametes hirsuta* сведены в таблицу.

Таблица

10

Сутки	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Концентрация глюкозы, г/л	25	19	16	10,7	1,4	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2
15 Концентрация этилового спирта, г/л	0	3,1	4,4	7,5	12,4	12,3	12,0	11,8	11,5	11,5	11,3	11,0

- Таким образом, культивирование этилового спирта с использованием описываемого штамма в сравнении с использованием известного штамма позволяет получить целевой спирт с выходом более чем на 12% масс. выше за более короткий промежуток времени. При этом полученный спирт не содержит примесей.

Пример 5. Получение этилового спирта из лигноцеллюлозных субстратов.

- В качестве субстратов используют: карбоксиметилцеллюлозы натриевую соль - 20 г/л, микрокристаллическую целлюлозу марки «Авицел» - 20 г/л, измельченную солому ржи с размером частиц 2-4 мм - 30 г/л. Субстраты помещают в качалочные колбы объемом 750 мл в указанных концентрациях, добавляют по 10 мл водопроводной воды. Колбы автоклавируют при температуре 121°C в течение 30 минут.

- Получают погруженную культуру *T. hirsuta* аналогично примеру 1. В стерильные колбы с субстратами помещают по 90 мл погруженной культуры, закрывают стерильными гидрозатворами, в качестве дополнительного стерилизующего вещества в гидрозатворах используют бледно-розовый раствор перманганата калия. Колбы термостатируют при 25°C в течение 6 суток.

- Определение концентрации этилового спирта проводят методом газовой хроматографии. Концентрация этилового спирта в культуральной жидкости через 6 суток сбраживания карбоксиметилцеллюлозы натриевой соли составляет 2,4 г/л, микрокристаллической целлюлозы - 2,1 г/л, измельченной соломы ржи - 2,0 г/л.

Получаемый спирт не содержит таких примесей, как ацетон и изопропанол.

- Таким образом, описываемый штамм позволяет продуцировать этиловый спирт повышенного выхода и качества из более широкого спектра используемого сырья.

(57) Формула изобретения

Штамм базидиального гриба *Trametes hirsuta* ВКПМ F-1287 - продуцент этилового спирта.

45