



УКРАЇНА

(19) UA (11) 86727 (13) C2

(51) МПК

C12P 19/14 (2008.01)

C12P 13/08 (2008.01)

C12P 13/14 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

## (54) ОДЕРЖАННЯ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК ШЛЯХОМ ФЕРМЕНТАЦІЇ

1

(21) а200808566

(22) 27.11.2006

(24) 12.05.2009

(86) PCT/EP2006/068927, 27.11.2006

(31) 10 2005 056 669.3

(32) 28.11.2005

(33) DE

(46) 12.05.2009, Бюл.№ 9, 2009 р.

(72) БОЙ МАТТІАС, ФРЕЄР ШТЕФАН

(73) БАСФ СЕ

(56) JP 2001309751, А, 06.11.2001

EP 0171218, А2, 12.02.1986

WO 2004113551, А, 29.12.2004

WO 02077252, А1, 03.10.2002

(57) 1. Спосіб одержання щонайменше однієї органічної сполуки, що містить щонайменше 3 атоми вуглецю або щонайменше 2 атоми вуглецю та щонайменше 1 атом азоту, шляхом ферментації, що включає такі стадії:

а1) подрібнення крохмальовмісної сировини з одержанням подрібненого матеріалу, який містить щонайменше частину твердих компонентів, що не містять крохмаль;

а2) суспендування подрібненого матеріалу у водній рідині та розрідження подрібненого матеріалу, що містить водну рідину, в присутності щонайменше одного ферменту, який розріджує крохмаль, при цьому одержують водне декстриновмісне середовище (1), яке включає крохмальовмісну сировину з щонайменше частиною твердих компонентів, що не містять крохмаль; та

б) ферментація водного середовища (1), що містить декстрин, для культивування мікроорганізму, здатного переробляти органічну сполуку.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що ферменти, які гідролізують декстрини до моносахаридів, додають у кількості менше 0,001 мас. %, у перерахунку на загальну масу крохмальовмісного середовища, яке використовують.

3. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що суспензію подрібненого матеріалу у водній рідині нагрівають до температури, вищої за температуру клейстеризації крохмалю, що входить до складу крохмальовмісної сировини.

2

4. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що нагрівання здійснюють в присутності ферменту, що розріджує крохмаль.

5. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що щонайменше частину подрібненого матеріалу в ході розрідження безперервно або періодично додають у водну рідину.

6. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що подрібнений матеріал у такій кількості суспендують та розріджують у водній рідині, що вміст сухої маси у одержаному водному середовищі (1), що містить декстрин, становить щонайменше 50 мас. %, у перерахунку на загальну масу середовища (1).

7. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що подрібнений матеріал у такій кількості суспендують та розріджують у водній рідині, що концентрація еквівалента глюкози одержаному у водному середовищі (1), що містить декстрин, становить щонайменше 40 мас. %, відповідно у перерахунку на загальну масу середовища (1).

8. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що мікроорганізм вибирають із мікроорганізмів, що виробляють ферменти, які гідролізують декстрини до моносахаридів.

9. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який додатково включає такі стадії:

б1) культивування здатного до перероблення органічної сполуки мікроорганізму у водному ферментаційному середовищі (2); та

б2) додавання середовища (1), що містить декстрин, у ферментаційне середовище (2), в якому декстрини, що входять до складу середовища (1), розщеплюються мікроорганізми, які переробляють органічну сполуку.

10. Спосіб за п. 9, який відрізняється тим, що ферментаційне середовище (2) на стадії б1) містить в основному середовище (1), здатні до перероблення органічної сполуки мікроорганізми, звичайні компоненти середовища та, в разі потреби, воду для розрідження.

11. Спосіб за п. 9 або 10, який відрізняється тим, що на стадії б1) використовують таку кількість середовища (1) для приготування ферментаційного середовища (2), що загальна концентрація цукрів у

(13) C2

(11) 86727

(19) UA

ферментаційному середовищі (2) становить від 6 до 30 мас. %, визначених як еквіваленти глюкози, у перерахунку на загальну масу ферментаційного середовища (2).

12. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що на стадії а1) як джерело крохмалю використовують зерна зернових культур.

13. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що подрібнений матеріал містить щонайменше 20 мас. % загальної кількості твердих компонентів крохмальвмісної сировини, що не містять крохмаль.

14. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що ферментом, який розрідує крохмаль, є  $\alpha$ -амілаза.

15. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що одержують органічну сполуку, вибрану із моно-, ди- та трикарбонових кислот, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю та, в разі потреби, гідроксильні групи, протейногенних та непротейногенних амінокислот, пуринових основ, піримідинових основ; нуклеозидів, нуклеотидів, ліпідів; насичених та ненасичених жирних кислот; діолів, що містять від 4 до 10 атомів вуглецю, багатоатомних спиртів, що містять 3 або більше гідроксильних груп, довголанцюгових спиртів, що містять щонайменше 4 атоми вуглецю, вуглеводів, ароматичних сполук, вітамінів, провітамінів, кофакторів, нутрицевтичних засобів, білків, каротиноїдів, кетонів, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, лактонів, біополімерів та циклодекстринів.

16. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що мікроорганізм для ферментації вибирають із природних або рекомбінантних мікроорганізмів, що переробляють щонайменше один із таких продуктів метаболізму: ферменти, амінокислоти, вітаміни, дисахариди, аліфатичні моно-, ди- та трикарбонові кислоти, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, аліфатичні гідроксикарбонові кислоти, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, кетони, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю,

алканоли, що містять від 4 до 10 атомів вуглецю, алкандіоли, що містять від 3 до 8 атомів вуглецю, та полігідроксикарбоати.

17. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що мікроорганізм вибирають із таких, що переробляють одну або кілька амінокислот.

18. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що мікроорганізм вибирають із таких, що переробляють одну або кілька аліфатичних моно-, ди- та трикарбонових кислот, які містять від 3 до 10 атомів вуглецю.

19. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що мікроорганізм вибирають із таких, що переробляють один або кілька ферментів.

20. Спосіб за п. 16 або 19, який **відрізняється** тим, що мікроорганізм вибирають із таких, що переробляють фітазу.

21. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що мікроорганізми вибирають із родів *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ashbya*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Clostridium* та *Rhizopus*.

22. Спосіб за п. 20, який відрізняється тим, що мікроорганізм вибирають із штамів роду *Corynebacterium*.

23. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що додатково щонайменше один продукт метаболізму мікроорганізмів збіднюють або виділяють із ферментаційного розчину та після цього в значній мірі видаляють леткі компоненти ферментаційного розчину, при цьому одержують тверду або напівтверду композицію білків.

24. Спосіб за одним із пп. 1-22, який **відрізняється** тим, що додатково леткі компоненти ферментаційного розчину без попереднього виділення або збіднення нелеткого продукту метаболізму мікроорганізмів та, в разі потреби, без попереднього виділення твердих компонентів виділяють щонайменше частково, при цьому одержують тверду композицію нелеткого продукту метаболізму мікроорганізмів.

Даний винахід стосується ферментативного одержання органічних сполук, що містять щонайменше 3 атоми вуглецю або щонайменше 2 атоми вуглецю та щонайменше один атом азоту при використанні середовища, яке містить декстрин, що включає щонайменше одну частину твердих компонентів крохмалювмісної сировини, що не містять крохмаль, для культивування мікроорганізмів.

Цукорвмісні рідкі середовища - це основне джерело поживних речовин для багатьох способів ферментації; використовувані мікроорганізми розщеплюють цукрові компоненти, що входять до складу середовищ, при цьому одержують органічний цільовий продукт. Спектр використовуваних з цією метою продуктів метаболізму мікроорганізмів тобто органічних сполук, включає, наприклад, низькомолекулярні леткі сполуки, такі як етанол, нелеткі продукти метаболізму, такі як амінокислоти,

вітаміни та каротиноїди, а також велику кількість інших речовин.

Для таких загальновідомих способів ферментації мікроорганізмами залежно від різних умов здійснення способів використовують різні джерела вуглецю: від чистої сахарози до бурякової і тростинної меласи, так званих „high test molasses” (інвертної тростинної меласи) аж до глюкози із гідролізатів крохмалю. У випадку біотехнологічного одержання L-лізину слід назвати також оцтову кислоту та етанол як використовувані у промислових масштабах спів субстрати (Pfefferle et al., *Biotechnological Manufacture of Lysine, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 79(2003), 59-112).

Виходячи із зазначених джерел вуглецю, були розроблені різні методи та способи ферментативного одержання на основі цукру продуктів метаболізму мікроорганізмів. На прикладі L-лізину ці ме-

тоди описують, наприклад, Pfefferle et al. (як зазначено вище) з огляду на одержання штамів, здійснення процесів та виробництво в широких масштабах

Важливим джерелом вуглецю для опосередкованого мікроорганізмами ферментативного одержання продуктів їх метаболізму є крохмаль. На попередніх стадіях реакції крохмаль необхідно спочатку розрідити та оцукрити перед його використанням у ролі джерела вуглецю в процесі ферментації. З цією метою крохмаль одержують із природного крохмаловмісного джерела, такого як картопля, маніока, зернові, наприклад, пшениця, кукурудза, ячмінь, жито, тритикале або рис, зазвичай у попередньо очищеній формі та після цього ферментативно розріджують та оцукрюють з метою подальшого використання в процесі ферментації для одержання бажаних продуктів метаболізму.

Поряд із використанням попередньо очищеної крохмаловмісної сировини описане також використання неочищеної крохмаловмісної сировини для одержання джерел вуглецю, необхідних для ферментативного одержання продуктів метаболізму мікроорганізмів. Зазвичай при цьому крохмаловмісну сировину спочатку подрібнюють перемелюванням. Після цього подрібнений матеріал піддають розрідженню та оцукрюванню. Оскільки цей подрібнений матеріал за своєю природою окрім крохмалю містить також ряд компонентів, що не містять крохмаль, які можуть негативно впливати на процес ферментації, то ці компоненти зазвичай відділяють перед початком ферментації. Відділення можна здійснювати безпосередньо після перемелювання (WO 02/077252; JP 2001-072701; JP 56-169594; CN 1218111), після розрідження (WO 02/077252; CN 1173541) або відразу після оцукрювання (CN 1266102; Beukema et al.: Production of fermentation syrups by enzymatic hydrolysis of potatoes; potatoe saccharification to give culture medium (Conference Abstract), Symp. Biotechnol. Res. Neth. (1983), 6; NL8302229). Однак у всіх варіантах у процесі ферментації використовують чистий гідролізат крохмалю.

Нові способи ферментативного одержання органічних сполук включають зокрема очищення крохмаловмісної сировини перед початком ферментації, наприклад, очищення розріджених та оцукрених розчинів крохмалю (JP 57159500), або пропонують методи, які дають можливість одержувати ферментаційні середовища із відновлюваних ресурсів (EP 1205557).

Неочищену крохмаловмісну сировину у великих масштабах використовують для одержання біоетанолу. При цьому крохмаловмісну сировину, зазвичай цілі зерна зернових культур, спочатку піддають сухому подрібненню, а потім крохмаловмісний компонент сировини гідролізують з використанням ферментів. Гідроліз можна здійснювати як періодично, наприклад, у резервуарах з мішалками, так і безперервно, наприклад, у вакуум-апаратах. Відповідні процеси описані, наприклад, в „The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries”, Jaques et al. (Hg.), Nottingham Univ. Press 1995,

ISBN 1-8977676-735, розділ 2, стор. 7-23, та в McAloon et al., „Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks”, NREL/TP-580-28893, National Renewable Energy Laboratory, October 2000.

Оскільки при ферментативному одержанні біоетанолу цільовий продукт одержують дистиляцією, то використання крохмаловмісної сировини з процесу сухого подрібнення у неочищеній формі не представляє собою велику проблему. Однак при використанні способу сухого подрібнення для одержання інших продуктів метаболізму мікроорганізмів потік твердої речовини, який через розчин цукру потрапляє у процес ферментації, є проблемою, оскільки він може негативно впливати на ферментацію, наприклад, на швидкість транспортування кисню або на потребу в кисні використовуваних мікроорганізмів (див. Mersmann, A. et al.: Selection and Design of Aerobic Bioreactors, Chem. Eng. Technol. 13 (1990), 357-370), або суттєво ускладнювати подальшу обробку.

Крім того при потрапленні твердої речовини вже на стадії одержання крохмаловмісної суспензії в'язкість суспензії може досягати критичної точки, в результаті чого суспензія, наприклад, понад 30 мас. % кукурудзяної муки у воді більше нездатна до однорідного змішування (Industrial Enzymology, 2 видан., T. Godfrey, S. West, 1996). При здійсненні звичайного методу це обмежує концентрацію глюкози. Однак у випадку ферментативного одержання біоетанолу цей факт є несуттєвим, оскільки через токсичність продукту високі концентрації і так є недоцільними для використовуваних в процесі ферментації дріжджів.

При ферментативному одержанні інших відмінних від етанолу органічних продуктів метаболізму принциповим недоліком є використання у ферментації цукровмісної сировини з низькою концентрацією цукру, оскільки це призводить до непропорційно високого розрідження ферментаційного розчину та в результаті цього до зниження бажаних кінцевих концентрацій цільових продуктів, що з одного боку вимагає високих затрат при їх одержанні з ферментаційного середовища та знижує просторово-часовий вихід. Ці проблеми стосуються особливо тих випадків, коли одержаний для масштабного виробництва біоетанолу гідролізат крохмалю, що зазвичай містить низькі концентрації цукру або відповідно глюкози приблизно до 30 або 33 мас. %, необхідно частково піддавати незначній побічній ферментації для одержання інших хімічних продуктів.

З іншого боку, вищі концентрації здатних до розщеплення моносахаридів у ферментаційному середовищі можуть призводити до інгібування ферментації або росту мікроорганізмів або як наслідок цього спостерігаються зміни в процесі метаболізму використовуваних мікроорганізмів. У випадку *E. coli* надто висока концентрація вільної глюкози призводить, наприклад, до утворення органічних кислот (ацетат), в той час як *Saccharomyces cerevisiae* в даному випадку переключається, наприклад, на ферментацію, незважаючи на те, що у вентильованих ферментерах міститься достатня

кількість кисню (ефект Крабтрі). Тому вищі концентрації здатних до розщеплення моносахаридів у цукорвмісних середовищах, які подають у ферментацію, в ході фази підживлення можуть негативно впливати на ферментацію. Проблематичним є також використання висококонцентрованих середовищ у періодичній фазі, тобто в ході фази росту мікроорганізмів у ферментаційній суміші, перед подачею у ферментацію живильним потоком іншого цукру, оскільки велика кількість штамів для росту потребує концентрації глюкози нижче 6 мас. %.

Через зазначені труднощі та обмеження способи сухого подрібнення, які широко використовуються для одержання біоетанолу, при ферментативному одержанні інших відмінних від етанолу продуктів метаболізму мікроорганізмів до цього часу не набули важливого економічного значення.

Спроби використати концепцію сухого подрібнення та пов'язані з цим способом принципи переваги при одержанні продукти метаболізму мікроорганізмів у промислових масштабах до цього часу були описані лише у зв'язку із використанням маніоки як крохмаловмісної сировини. Так, наприклад, JP 2001/275693 описує спосіб ферментативного одержання амінокислот, при якому як крохмаловмісну сировину використовують очищені бульби маніоки, які піддають сухому подрібненню. Однак для здійснення способу необхідно, щоб розмір частинок подрібненого матеріалу становив  $\leq 150$  мкм. Тому в процесі здійснюваною з цією метою фільтрації частини використовуюваного подрібненого матеріалу, включаючи компоненти, що не містять крохмаль, виділяють перед розрідженням/оцукрюванням одержаного крохмалю та подальшою ферментацією. При здійсненні такого способу одержують середню концентрацію цукру. Подібний спосіб описаний в JP 2001/309751 для одержання кормової добавки, що містить амінокислоту.

Підвищені концентрації цукру у використовуюваному для ферментації рідкому середовищі можна одержувати при застосуванні подрібненого матеріалу для оцукрювання, що включає тверді компоненти крохмаловмісної сировини, які не містять крохмаль, за допомогою способу, описаного в заявці WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) даного заявника. При цьому виділення твердих компонентів крохмаловмісної сировини, які не містять крохмаль, перед ферментацією несподіваним чином виявилось непотрібним. Описаний спосіб можна здійснювати при оцукрюванні *in situ* розрідженої крохмаловмісної сировини. Подібний спосіб, що включає використання вибраної серед зерен зернових культур крохмаловмісної сировини, описаний у заявці PCT/EP2006/066057 (пріоритетна заявка на патент DE 10 2005 042 541.0) даного заявника.

Тому задача даного винаходу полягала у розробці іншого способу для одержання органічних сполук шляхом ферментації, який би не вимагав ніякого або принаймні ніякого повного попереднього виділення твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль. Спосіб повинен зокрема вимагати використання відносно незнач-

ної кількості приладів та дозволяти застосування середовищ з високою концентрацією цукру.

Крім того спосіб повинен відрізнятися легкістю у застосуванні використовуваних середовищ та їх безпроблемним використанням у процесі ферментації. Зокрема спосіб повинен дозволяти використання зернових культур як крохмаловмісної сировини.

Несподівано з'ясували, що ферментативний спосіб одержання органічних сполук, незважаючи на властиве йому введення великої кількості твердих речовин може бути здійснений ефективно таким чином: спочатку шляхом подрібнення та розрідження без попереднього повного виділення твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль, одержують середовище (1), що містить декстрин, яке без додавання оцукрювальних ферментів піддають ферментації.

Таким чином предметом даного винаходу є спосіб одержання щонайменше однієї органічної сполуки, що містить щонайменше 3 атоми вуглецю або щонайменше 2 атоми вуглецю та щонайменше 1 атом азоту, шляхом ферментації, що включає такі стадії:

a1) подрібнення крохмаловмісної сировини при одержанні подрібненого матеріалу, який містить щонайменше частину твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль;

a2) суспендування подрібненого матеріалу у водній рідині та розрідження подрібненого матеріалу, що містить у водній рідині, в присутності щонайменше одного ферменту, який розріджує крохмаль, при цьому одержують середовище (1), що містить декстрин, яке включає щонайменше частину твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль; та

b) застосування водного середовища (1), що містить декстрин, у ферментації для культивування мікроорганізму, здатного перевиробляти органічну сполуку;

причому ферменти, які гідролізують декстрини до моносахаридів, не додають або додають у кількості менше 0,001 мас. %, у перерахунку на загальну вагу використовуюваного крохмаловмісного середовища.

Спосіб ферментації згідно з винаходом, незважаючи на вміст твердих компонентів використовуюваної крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль, у середовищі (1), що містить декстрин, можна здійснювати ефективно, без додавання оцукрювальних ферментів. Однак можна додавати незначні кількості, які є недостатніми для повного оцукрювання, зазвичай становлять менше 0,001 мас. %, зокрема менше 0,0005 мас. %, у перерахунку на загальну вагу використовуюваної крохмаловмісної сировини.

Завдяки використанню декстринів для культивування мікроорганізму можна встановлювати високу концентрацію здатних до розщеплення цукрів у ферментаційному середовищі як у періодичній фазі, так і у фазі підживлення без ініціювання небажаних побічних реакцій, так що вдається уникнути небажаного розрідження ферментаційного розчину. Крім того за допомогою способу згідно з

винаходом значною мірою вирішуються проблеми із в'язкістю, які можуть виникати при розрідженні крохмаловмісної сировини при більш високих концентраціях подрібненого матеріалу.

Тут та надалі вирази "середовище, що містить декстрин" та "рідина, що містить декстрин" є синонімічними. Фахівцям зрозуміло, що використовуваний у ферментації мікроорганізм повинен бути здатним розщеплювати декстрини, що входять до складу водного декстринвмісного середовища (1), без необхідності їх гідролізу шляхом зовнішньої подачі оцукрювальних ферментів у ди- та/або моносахариди. При цьому декстрини розщеплюються мікроорганізмом, скоріше за все після їх гідролізу штам-характерними оцукрювальними ферментами, наприклад, штам-характерними глюкоамілазами. Особливо вигідним для способу згідно з винаходом є варіант, при якому в останньому випадку в ході ферментації швидкість оцукрювання, зокрема вивільнення глюкози, автоматично доводять до необхідного значення, враховуючи потребу мікроорганізму, з одного боку кількістю біомаси, а з іншого боку рівнем експресії штам-характерних оцукрювальних ферментів.

Поняття „розрідження” тут та в усьому тексті означає гідролітичне розщеплення крохмалю до олігосахаридів, зокрема декстринів.

Поняття „оцукрювання” або відповідно „оцукрення” тут та в усьому тексті означає гідроліз декстринів до моносахаридів, зокрема до таких моносахаридів, як глюкоза. Під „здатним до оцукрювання ферментом” розуміють фермент, який гідролізує декстрини до моносахаридів.

Під поняттям „декстрин” тут та в усьому тексті розуміють олігосахариди, одержані гідролітичним розщепленням крохмалю, які, як правило, складаються із 3-18, зокрема 6-12 моносахаридних одиниць, зокрема одиниць глюкози.

Поняття „вміст еквівалентів глюкози” та „концентрація цукру” означають загальну концентрацію моно-, ди- та олігосахаридів у середовищі, яка потенційно існує для ферментації. Поняття „еквівалент глюкози” включає також відмінні від глюкози здатні до розщеплення цукри або компоненти цукрів.

Поняття „перевиробляють” або „перевироблення” тут та в усьому тексті використовують у випадку мікроорганізму для позначення його властивості виробляти один або кілька продуктів його метаболізму у кількості, яка перевищує кількість, необхідну для розмноження мікроорганізму, в результаті чого спостерігається збагачення ферментаційного середовища, причому це збагачення може відбуватися за межами клітин або внутрішньоклітинно.

Як крохмаловмісну сировину для здійснення способу згідно з винаходом використовують передусім сухі зернові культури або насіння, які у висушеному стані характеризуються вмістом крохмалю щонайменше 40 мас. %, переважно щонайменше 50 мас. %. Їх вибирають серед багатьох культивованих на сьогоднішній день у великих масштабах зернових, таких як кукурудза, пшениця, овес, жито, ячмінь, тритикале, рис, а також в культурах цукрового буряка, картоплі, маніоки та

різних сортів проса, наприклад, сорго. Переважно крохмаловмісну сировину вибирають з групи зернових, зокрема з групи, що включає кукурудзу, жито, тритикале та пшеницю. Загалом спосіб згідно з винаходом здійснюють з використанням аналогічної крохмаловмісної сировини, як, наприклад, суміш різних крохмаловмісних зернових культур або насіння.

Для одержання рідини, що містить декстрин, на стадії a1) відповідну крохмаловмісну сировину подрібнюють з або без додавання рідини, наприклад, води, переважно без додавання рідини. Крім того сухе подрібнення може бути комбіноване з подальшим післяреакційним подрібненням.

Для сухого подрібнення використовують зазвичай молоткові млини, роторні млини або валково-дробильні млини; для вологого подрібнення придатними є міксери з мішалками, шарові млини з мішалками, циркуляційні млини, дискові млини, кільцеві млини, вібраційні млини або планетарні млини. Загалом можуть бути використані і інші млини. Необхідні для вологого подрібнення кількості рідини фахівці визначають у ході звичайних досліджень. Зазвичай їх вибирають такими, щоб вміст твердої речовини становив від 10 до 20 мас. %.

Шляхом подрібнення встановлюють необхідний для подальшої стадії способу розмір зерна. При цьому вигідним виявився варіант, коли використовують подрібнені частинки, тобто гранульні компоненти, одержаного при подрібненні, зокрема при сухому подрібненні, на стадії a1) подрібненого матеріалу, розмір яких становить від 100 до 630 мкм у кількості від 30 до 100 мас. %, переважно від 40 до 95 мас. % та особливо переважно від 50 до 90 мас. %. Переважно одержаний подрібнений матеріал містить 50 мас. % подрібнених частинок, розмір яких становить понад 100 мкм. Як правило, щонайменше 95 мас. % подрібнених частинок мають розмір менше 2 мм. При цьому розмір частинок визначають ситовим аналізом з використанням вібраційного аналізатора. Вигідним для одержання високих кількостей продукту на виході є незначний розмір частинок. Однак надто маленький розмір частинок може викликати проблеми, зокрема через утворення грудок/агломерацію, в ході перемішування подрібненого матеріалу під час розрідження або при обробці, наприклад, при сушці твердих речовин після ферментації.

Зазвичай подрібнені матеріали характеризують ступенем подрібнення або типами муки, причому ці фактори настільки пов'язані один з одним, що при збільшенні ступеня подрібнення збільшується також кількість типів муки. Ступінь подрібнення відповідає масовій кількості одержаної муки, у перерахунку на 100 масових частин використаного подрібненого матеріалу. В той час як при подрібненні спочатку в осад випадає чиста тонко подрібнена мука, наприклад, із середини зерна зернової культури, при подальшому подрібненні, тобто при збільшенні ступеня подрібнення, вміст сирцю та оболонки збільшується, а вміст крохмалю при цьому зменшується. Таким чином ступінь подрібнення відображається також у так званих типах муки, які використовують як числові показ-

ники для класифікації муки, зокрема муки зернових, та які базуються на зольності муки (так звана шкала зольності). При цьому типи муки відображають вміст золи (мінеральних речовин) в мг, що залишається при спалюванні 100 г сухої речовини муки. У випадку муки зернових культур вищий тип означає вищий ступінь подрібнення, оскільки зерно зернової культури містить приблизно 0,4 мас. %, а оболонка приблизно 5 мас. % золи. При низькому ступеню подрібнення мука зернових складається переважно із подрібнених частинок муки, тобто крохмаловмісного компоненту зерна зернових; при високому ступеню подрібнення мука зернових містить також подрібнений білковий алейроновий шар зерна, у випадку шроту - також компоненти білкового збагаченого жирами зародку, а також волокнистих і зольних оболонок насіння. Для досягнення поставлених згідно з винаходом цілей перевагу надають муці, що характеризується високим ступенем подрібнення або відповідно високим типом. Якщо зернові культури використовують як крохмаловмісну сировину, то при цьому переважно цілі неочищені зерна подрібнюють та піддають подальшій обробці, в разі потреби, після попереднього механічного розділення зародку та м'якоті.

Згідно з винаходом використовуваний подрібнений матеріал містить щонайменше частину, переважно щонайменше 20 мас. %, зокрема щонайменше 50 мас. %, особливо переважно щонайменше 90 мас. % та найбільш переважно щонайменше 99 мас. % твердих компонентів, що входять до складу подрібнених зерен зернових культур та не містять крохмаль, відповідно до ступеню подрібнення. Щодо крохмаловмісних компонентів подрібненого матеріалу (та кількості здатного до розщеплення цукру в середовищі (1), що містить декстрин), то вміст твердих компонентів, що не містять крохмаль, у подрібненому матеріалі становить переважно щонайменше 10 мас. % та зокрема щонайменше 15 мас. %, наприклад, від 15 до 75 мас. %, зокрема від 20 до 60 мас. %.

Призначений для розрідження подрібнений матеріал на стадії a2) згідно з винаходом змішують з водною рідиною, наприклад, свіжою водою, рециркульованою технологічною водою, наприклад, зі стадії ферментації, або із сумішшю цих рідин. При цьому, як правило, одержують водну суспензію. Зазвичай із водною рідиною змішують та розріджують таку кількість крохмаловмісної сировини або відповідно подрібненого матеріалу, що концентрація еквівалентів глюкози у одержаній водній рідині (1), що містить декстрин, становить щонайменше 40 мас. %, у перерахунку на загальну вагу середовища (1). Вміст сухої маси у одержаному таким чином середовищі (1) становить зазвичай щонайменше 50 мас. %, у перерахунку на загальну вагу середовища (1).

Для здійснення способу згідно з винаходом можливо також використовувати для суспендування твердого подрібненого матеріалу водну рідину доводити до трохи підвищеної температури, наприклад, у діапазоні від 40 до 60 °C. Однак переважно рідини використовують при кімнатній температурі.

Для здійснення розрідження крохмаловмісного компоненту подрібненого матеріалу відповідно до стадії a2) вигідним виявилось перед початком розрідження змішування лише частини загальної кількості подрібненого матеріалу із водною рідиною та додавання залишкової кількості у водну рідину в ході розрідження безперервним або періодичним способом.

Розрідження подрібненого матеріалу відповідно до стадії a2) можна здійснювати звичайними відомими фахівцям способами, наприклад, методами, описаними у цитованій на початку публікації „The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries”, розділ 2, стор. 7-23.

Згідно з винаходом розрідження на стадії a2) здійснюють в присутності щонайменше одного ферменту, що розріджує крохмаль. З цією метою можуть бути використані загалом всі ферменти, що розріджують крохмаль, зокрема,  $\alpha$ -амілази (клас ферментів EC 3.2.1.1), наприклад,  $\alpha$ -амілази, які одержують із *Bacillus licheniformis* або *Bacillus stearothermophilus*, та зокрема такі, які використовують для розрідження одержаних способом сухого подрібнення матеріалів в рамках одержання біоетанолу. Придатні для розрідження  $\alpha$ -амілази наявні у продажу, наприклад, як продукти фірми Novozymes під назвою Termamyl 120 L, тип L; або фірми Genencor під назвою Spezyme. Для розрідження може бути застосована також комбінація різних  $\alpha$ -амілаз

При цьому одержують водну рідину, що містить розріджений крохмаловмісний компонент подрібненого матеріалу, зазвичай декстрини, які містять, як правило, від 3 до 18, зокрема від 6 до 12 моносахаридних одиниць, в разі потреби, інші олігосахариди, в разі потреби, незначні кількості моно- та/або дисахаридів (як правило, < 30 мас. %, часто < 25 мас. %, < 20 мас. %, зокрема < 10 мас. %, у перерахунку на загальну кількість моно-, ди- та олігосахаридів), а також компоненти використовуваного подрібненого матеріалу, що не містять крохмаль, зокрема тверді компоненти використовуваного для розрідження подрібненого матеріалу, що не містять крохмаль.

Переважно кількості ферменту, що розріджує крохмаль, та подрібненого матеріалу, необхідно вибирати таким чином, щоб в'язкість в ході процесу желатинування була достатньо низькою, щоб забезпечити ефективне перемішування суспензії, наприклад, шляхом змішування. Переважно в'язкість реакційної суміші в ході процесу желатинування становить максимум 20 Па·с, переважно максимум 15 Па·с та найбільш переважно максимум 8 Па·с. В'язкість вимірюють, як правило, віскозиметром Хааке типу Roto Visko RV20 із системою вимірювання M5 та вимірювальним пристроєм MVDIN при температурі 50 °C та швидкості зсуву 200 с<sup>-1</sup>.

$\alpha$ -амілазу (або відповідно використовуваний для розрідження крохмалю фермент) можна з самого початку помістити у реакційну посудину або додавати в ході стадії a2). Переважно частину необхідної на стадії a2)  $\alpha$ -амілази додають на початку стадії a2) або ця кількість уже існує в реак-

торі. Загальна кількість  $\alpha$ -амілази зазвичай становить від 0,002 до 3,0 мас. %, переважно від 0,01 до 1,5 мас. % та особливо переважно від 0,02 до 0,5 мас. %, у перерахунку на загальну кількість використовуваної крохмаловмісної сировини.

Розрідження можна здійснювати при температурі, вищій або нижчій за температуру желатинування. Переважно розрідження на стадії a2) здійснюють принаймні час від часу при температурі, вищій за температуру желатинування або відповідно температурі клейстеризації використовуваного крохмалю (так званий процес варіння). При цьому необхідна для відповідного крохмалю температура відома фахівцям (див. цитовану на початку публікацію „The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries”, розділ 2, стор. 11) або може бути визначена ними в ході звичайних експериментів. Як правило, температуру вибирають в діапазоні від 80 до 165 °C, переважно від 90 до 150 °C, особливо переважно від 100 до 140 °C, причому температура, як правило, на щонайменше 5 K, зокрема на щонайменше 10 K та особливо переважно на щонайменше 20 K, наприклад, від 10 до 100 K, зокрема від 20 до 80 K, вище за температуру желатинування. При таких температурах гранульна структура крохмалю руйнується (желатинування), в результаті чого можливим стає його ферментативне розщеплення.

Для оптимальної дії  $\alpha$ -амілази (або відповідно використовуваного для розрідження крохмалю ферменту) стадію a2) переважно принаймні час від часу здійснюють при значенні pH у оптимальному діапазоні для розріджувального ферменту, часто при значенні pH у слабо кислому діапазоні, зокрема від 4,0 до 7,0, особливо переважно від 5,0 до 6,5, причому зазвичай відповідне значення pH встановлюють перед або на самому початку стадії a2); це значення pH контролюють в ході процесу розрідження та, в разі потреби, регулюють. Встановлюють значення pH переважно за допомогою розріджених мінеральних кислот, таких як  $\text{H}_2\text{SO}_4$  або  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , або за допомогою розріджених лугів, таких як NaOH або KOH.

У переважній формі виконання винаходу для розрідження крохмаловмісного компоненту подрібненого матеріалу на стадії a2) у водну рідину безперервно або періодично додають щонайменше частину подрібненого матеріалу. Переважно в ході розрідження, однак до здійснення можливого оцукрювання у реактор додають щонайменше 40 мас. %, зокрема щонайменше 50 мас. % та особливо переважно щонайменше 55 мас. %. Часто витратна кількість не перевищує 90 мас. %, зокрема 85 мас. % та особливо переважно 80 мас. %. Переважно частину використовуваного подрібненого матеріалу додають у реактор в умовах, які встановлюють для здійснення розрідження. Додавання можна здійснювати періодично, тобто кількома окремими порціями, які складають переважно не більше 30 мас. %, особливо переважно не більше 20 мас. %, наприклад, від 1 до 30 мас. % та зокрема від 2 до 20 мас. % загальної кількості подрібненого матеріалу, що підлягає розрідженню, або безперервно. Важливим у цій формі виконан-

ня є те, що на початок розрідження лише частина подрібненого матеріалу, переважно не більше 60 мас. %, зокрема не більше 50 мас. % та особливо переважно не більше 45 мас. % подрібненого матеріалу, знаходиться у реакторі, а іншу частину подрібненого матеріалу додають в ході розрідження.

Розрідження можна здійснювати також безперервно, наприклад, у багатостадійному каскаді реакцій.

У переважній формі виконання винаходу стадію a2) способу згідно з винаходом здійснюють таким чином: спочатку часткову кількість щонайбільше 60 мас. %, переважно щонайбільше 50 мас. % та особливо переважно щонайбільше 45 мас. %, наприклад, від 10 до 60 мас. %, зокрема від 15 до 50 мас. % та особливо переважно від 20 до 45 мас. %, у перерахунку на загальну кількість подрібненого матеріалу, суспендують водній рідині та після цього здійснюють розрідження.

Відповідно до іншої переважної форми виконання винаходу періодичне або безперервне, зокрема порційне додавання частини подрібненого матеріалу в присутності щонайменше однієї  $\alpha$ -амілази здійснюють таким чином, що в'язкість рідкого середовищу становить максимум 20 Па·с, переважно максимум 15 Па·с та особливо переважно максимум 8 Па·с. Для постійного контролю в'язкості вигідним виявився той варіант, у якому щонайменше 25 мас. %, переважно щонайменше 35 мас. % та особливо переважно щонайменше 50 мас. % від загальної кількості використовуваного подрібненого матеріалу додають при температурі, вищій за температуру желатинування крохмалю, що входить до складу подрібненого матеріалу. Крім того контроль в'язкості можна також підтримувати шляхом порційного додавання щонайменше одного ферменту, який розріджує крохмаль, переважно  $\alpha$ -амілази, та/або щонайменше одного оцукрювального ферменту, переважно глюкоамілази.

Для здійснення способу згідно з винаходом водну рідину, використовувану для суспендування твердого подрібненого матеріалу, можна попередньо нагрівати до трохи підвищеної температури, наприклад, у діапазоні від 40 до 60 °C. Однак переважно рідини використовують при кімнатній температурі.

Потім у суспензію подрібненого матеріалу додають фермент, який розріджує щонайменше один крохмаль, переважно  $\alpha$ -амілазу. Якщо частину подрібненого матеріалу додають саме в ході розрідження, то спочатку додають переважно лише частину  $\alpha$ -амілази, наприклад, від 10 до 70 мас. % та зокрема від 20 до 65 мас. %, у перерахунку на загальну кількість використовуваної на стадії a2)  $\alpha$ -амілази. У цьому випадку кількість  $\alpha$ -амілази, яку додають у цей момент часу, залежить від активності відповідної  $\alpha$ -амілази відносно використовуваної крохмаловмісної сировини в умовах реакції та становить зазвичай від 0,0004 до 2,0 мас. %, переважно від 0,001 до 1,0 мас. % та особливо переважно від 0,02 до 0,3 мас. %, у перерахунку на загальну кількість використовуваної крохмаловмісної сировини. При цьому альтернативно частина

$\alpha$ -амілази може бути змішана з використовуваною рідиною перед приготуванням суспензії.

Переважаю витратну кількість або часткову кількість  $\alpha$ -амілази додають у суспензію перед початком нагрівання до необхідної для розрідження температури, зокрема при кімнатній або трохи підвищеній температурі, наприклад, у діапазоні від 20 до 30 °C.

Після цього приготовану таким чином суспензію нагрівають переважно до температури, вищою за температуру желатинування використовуваного крохмалю. Як правило, температуру вибирають у діапазоні від 80 до 165 °C, переважно від 90 до 150 °C та особливо переважно від 100 до 140 °C, причому ця температура переважно на щонайменше 5 K, зокрема на 10 K та особливо переважно на щонайменше 20 K, наприклад, на 10-100 K, зокрема на 20-80 K, вище за температуру желатинування. Контролюючи в'язкість, в разі потреби, у крохмаловмісну суспензію поступово додають іншу частину крохмаловмісної сировини, наприклад, відповідно від 1 до 30 мас. % та зокрема від 2 до 20 мас. %, у перерахунку на загальну витратну кількість подрібненого матеріалу. У цьому випадку використовувану в ході розрідження частину подрібненого матеріалу переважно додають у реакційну суміш щонайменше 2, переважно щонайменше 4 та особливо переважно щонайменше 6 частковими порціями. Альтернативно у цій формі виконання додавання невикористаної при приготуванні суспензії часткової кількості подрібненого матеріалу можна здійснювати безперервно в ході процесу розрідження. При додаванні температура переважно має бути вищою за температуру желатинування крохмалю.

Після досягнення бажаної температури або відповідно, в разі потреби, після завершення додавання подрібненого матеріалу реакційну суміш зазвичай ще протягом якогось часу, наприклад, від 10 до 60 хвилин або довше, якщо необхідно, тримають при температурі, вищій за температуру желатинування крохмалю, тобто уварюють. Після цього реакційну суміш, як правило, охолоджують до трохи нижчої температури, яка однак переважно вища за температуру желатинування, наприклад, до 70-90 °C. Потім, в разі потреби, додають іншу частину  $\alpha$ -амілази, переважно основну кількість. У цьому випадку кількість  $\alpha$ -амілази, яку додають у цей момент часу, залежно від активності використовуваної  $\alpha$ -амілази в умовах реакції становить переважно від 0,002 до 2,0 мас. %, особливо переважно від 0,01 до 1,0 мас. % та найбільш переважно від 0,02 до 0,4 мас. %, у перерахунку на загальну кількість використовуваної крохмаловмісної сировини.

Для повного розщеплення крохмалю до декстринів реакційну суміш доти тримають при встановленій температурі або, в разі потреби, надалі нагрівають, доки тест на виявлення крохмалю йодом або, в разі потреби, інший тест на виявлення крохмалю не даватиме негативних результатів або щонайменше в основному не буде негативним. В разі потреби, з цією метою у реакційну суміш можна додавати ще одну або кілька частин  $\alpha$ -амілази, наприклад, у кількості від 0,001 до 0,5 мас. % та

переважно від 0,002 до 0,2 мас. %, у перерахунку на загальну кількість використовуваної крохмаловмісної сировини.

Альтернативно водну суспензію, що містить подрібнений матеріал, для розрідження крохмаловмісного компоненту можна спочатку нагрівати шляхом введення водяної пари до температури, вищою за температуру клейстеризації крохмалю, що входить до складу крохмаловмісної сировини або відповідного подрібненого матеріалу. Зазвичай нагрівають до темперами, яка на щонайменше 10 K та зокрема на щонайменше 20 K, наприклад, на 10-100 K, зокрема на 20-80 K вища за відповідну температуру клейстеризації. Зокрема суспензію нагрівають до температури від 90 до 150 °C, особливо переважно від 100 до 140 °C.

Під використовуваної для нагрівання водяною парою розуміють зазвичай перегріту водяну пару, температура якої становить щонайменше 105 °C, зокрема щонайменше 110 °C, наприклад, від 110 до 210 °C. Переважно пару вводять у суспензію при надлишковому тиску. Таким чином тиск пари становить переважно щонайменше 1,5 бар, наприклад, від 1,5 до 16 бар, зокрема від 2 до 12 бар.

Введення водяної пари у суспензію здійснюють, як правило, таким чином, щоб пара при надлишковому тиску, переважно від 1 до 10 або 11 бар, зокрема від 1,5 до 5 бар, та переважно при більш високій швидкості проникала у суспензію. Внаслідок введення водяної пари суспензія моментально нагрівається до температури вище 90 °C, тобто до температури, вищою за температуру клейстеризації.

Переважно нагрівання водяною парою здійснюють в установці з безперервною дією, в яку суспензія безперервно подається при певному робочому тиску, який одержують, враховуючи в'язкість суспензії, швидкість подачі та геометрію установки, та в яку в області подачі суспензії завантажують гарячу пару при надлишковому тиску, у перерахунку на робочий тиск, через регульоване сопло. В результаті введення пари при надлишковому тиску суспензія не лише нагрівається, в систему потрапляє також механічна енергія, яка сприяє подальшому подрібненню частинок подрібненого матеріалу та особливо рівномірній подачі енергії і як наслідок - особливо рівномірній клейстеризації зернистих крохмаловмісних частинок у подрібненому матеріалі. Зазвичай такі установки мають трубчасту геометрію. Переважно завантаження пари здійснюють у напрямку поздовжньої вісі трубчастої установки. Подачу суспензії здійснюють, як правило, під кутом щонайменше 45° або перпендикулярно. Регульоване сопло, як правило, має конічну форму, що звужується в напрямку току пари. В цьому соплі передбачена голка або розміщений на зміщуваному у поздовжньому напрямку стрижні затвор. Голка або затвор разом з конусом сопла утворюють щілину. Шляхом зміщення голки або стрижня у поздовжньому напрямку можна простим способом встановлювати розмір щілини та в результаті цього площу поперечного перерізу отвору сопла, за допомогою чого можна регулювати швидкість подачі пари.



Зазвичай ці установки включають також змішувальну трубу, в яку суспензію подають після завантаження пари та вивантажують із установки. Ця змішувальна труба, як правило, розміщена у напрямку завантаження пари та перпендикулярно підведенню основної речовини. Змішувальна труба разом із соплом зазвичай утворюють щілину, через яку транспортується суспензія. Через цю щілину при транспортуванні на суспензію діють додаткові зрізувальні сили, які підвищують механічну подачу енергії у суспензію. Змішувальна труба може бути встановлена з можливістю переміщення у поздовжньому напрямку. Шляхом зміщення труби вдається простим способом встановити розмір щілини і таким чином регулювати перепад тиску в установці.

Такі установки відомі з рівня техніки під назвою вакуум-апарат, наприклад, представлена в „The Alcohol Textbook”, розділ 2, loc. cit, фіг. 13 установка, та наявні у продажу, наприклад, під назвою HYDROHEATER® фірми Hydro Thermal Corp. Waukesha WI, USA.

При безперервному здійсненні реакції оброблену водяною парою суспензію вводять у післяреакційну зону з метою продовження процесу желатинування крохмаловмісних компонентів. У післяреакційній зоні, як правило, встановлюється надлишковий тиск, зазвичай абсолютний тиск від 2 до 8 бар. Температури в післяреакційній зоні становлять зазвичай від 90 до 150 °C. Час перебування у цій реакційній зоні залежно від температури суспензії може становити від 1 хвилини до 4 годин. Післяреакційні зони, як правило, мають трубчасту або колончасту форму. В одній із форм виконання післяреакційна зона має форму вертикально розміщеної колони. При цьому суспензію на виході із установки для обробки парою завантажують у верхній частині колони та вивантажують у нижній частині. Відповідно до іншої форми виконання винаходу післяреакційна зона має трубчасту форму.

Після виходу із післяреакційної зони, як правило, знижують тиск суспензії, після чого здійснюють розрідження. Переважно зниження тиску здійснюють як випаровування миттєвої дії з метою охолодження суспензії переважно до температури нижче 100 °C, зокрема нижче 85 °C. Після цього, як правило, здійснюють розрідження розщепленого таким чином крохмалю в окремій реакційній посудині. Розрідження може бути здійснене описаними вище способами.

Відповідно до іншої переважної форми виконання винаходу у суспензію подрібненого матеріалу у водній рідині перед нагріванням водяною парою додають щонайменше одну частину або загальну кількість, як правило, щонайменше 50 %, зокрема щонайменше 80 % загальної кількості або загальну кількість ферменту, що розріджує крохмаль. Таким чином розрідження здійснюють в ході нагрівання до температури, вищої за температуру клейстеризації. Нагрівання водяною парою та післяреакційну фазу здійснюють відповідним чином. Подальше розрідження у окремій реакційній посудині можна не здійснювати. Однак переважно таке розрідження все ж таки здійснюють для завершення процесу розщеплення крохмалю до декстринів.

Для стабілізації використовуваних ферментів, в разі потреби, концентрацію іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , наприклад, за допомогою  $\text{CaCl}_2$ , встановлюють на специфічному для ферментів оптимальному рівні. Придатні значення концентрації фахівці визначають при проведенні звичайних досліджень. Якщо, наприклад, як  $\alpha$ -амілазу використовують термаміл, то вигідними є концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , що становлять, наприклад, від 10 до 100 м.ч., переважно від 20 до 80 м.ч. та особливо переважно від приблизно 30 до 70 м.ч. у рідкому середовищі, причому показники м.ч. стосуються ваги та означають г/1000 кг.

Для повного розщеплення крохмалю до декстринів реакційну суміш доти тримають при встановленій температурі, доки тест на виявлення крохмалю йодом або, в разі потреби, інший тест на виявлення крохмалю не даватиме негативних результатів або щонайменше в основному не буде негативним. В разі потреби, з цією метою у реакційну суміш можна додавати ще одну або кілька частин  $\alpha$ -амілази, наприклад, у кількості від 0,001 до 0,5 мас. % та переважно від 0,002 до 0,2 мас. %, у перерахунку на загальну кількість використовуваної крохмаловмісної сировини.

Оскільки для одержання рідини (1), що містить декстрин, як правило, використовують подрібнений матеріал, який в основному містить всі або майже всі компоненти крохмаловмісної сировини або принаймні поряд зі крохмалем включає також частину твердих компонентів, які не містять крохмаль (тобто повного виділення твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль, не відбувається), то одержана рідина (1), що містить декстрин, включає також частину або загальну кількість твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль. Це часто обумовлює потрапляння певної кількості фітату, наприклад, із зернових культур, що в жодному разі не слід залишати поза увагою. З метою уникнення одержуваного при цьому інгібувального впливу у середовище (1) на стадії a2) вигідно додавати щонайменше одну фітазу до його подачі на стадію ферментації. Додавання фітази можна здійснювати до, під час або після розрідження, якщо вона має необхідну термостійкість. При цьому можуть бути використані будь-які фітази, якщо їх активність в умовах реакції обмежується лише незначним чином. Перевагу надають фітазам, температурна стабільність (T50) яких становить > 50 °C та особливо переважно > 60 °C. Кількість фітази становить зазвичай від 1 до 10000 одиниць/кг крохмаловмісної сировини та зокрема від 10 до 4000 одиниць/кг крохмаловмісної сировини.

Крім того в ході процесу одержання рідини (1), що містить декстрин, вигідним виявилось також додавання інших ферментів, наприклад, таких як пулюланизи, целюлози, геміцелюлази, глюканизи, ксиланизи або протеази. Додавання цих ферментів може позитивно впливати на в'язкість, тобто зменшувати її (наприклад, шляхом розщеплення довголанцюгових глюканів та/або (арабіно-)ксиланів), сприяти вивільненню здатних до метаболізму глюкозидів, а також (залишкового) крохмалю. Використання протеаз має аналогічні переваги, причому в даному випадку додатково можуть

бути вивільнені амінокислоти як фактори росту для ферментації.

Концентрація еквівалентів глюкози у одержаній на стадії а2) рідині (1), що містить декстрин, як правило, становить щонайменше 20 мас. % (= 200 г/кг), зокрема щонайменше 40 мас. % та особливо щонайменше 50 мас. %, часто від 30 до 75 мас. %, переважно від 40 до 70 мас. %, зокрема від 50 до 65 мас. %, відповідно у перерахунку на загальну вагу середовища (1).

Вміст сухої маси у одержаній таким чином рідині (1) зазвичай не перевищує щонайменше 25 мас. %, переважно щонайменше 40 мас. %, зокрема щонайменше 50 мас. %, особливо щонайменше 60 мас. % та, як правило, 80 мас. %, відповідно у перерахунку на загальну вагу середовища (1).

Еквіваленти глюкози, що входять до складу одержаної таким чином рідини (1), що містить декстрин, існують в основному у формі олігосахаридів, зокрема декстринів. Основним компонентом цих олігосахаридів або відповідно декстринів є зазвичай глюкоза, причому середовище може містити також незначні кількості моно- та/або дисахаридів та олігосахаридних одиниць, що складаються з інших моносахаридних одиниць. Зазвичай цукорвмісні компоненти середовища (1), що містить декстрин, тобто моно-, ди- та олігосахариди, містять олігосахариди, зокрема декстрини, у кількості щонайменше 70 мас. %, часто щонайменше 75 мас. %, зокрема щонайменше 80 мас. %, особливо щонайменше 90 мас. %, тобто вміст моно- та дисахаридів становить менше 30 мас. %, часто менше 25 мас. %, зокрема менше 20 мас. % та особливо менше 10 мас. %. Зазвичай вміст глюкози, у вільній або зв'язаній формі, серед еквівалентів глюкози середовища (1) становить від 50 до 99 мас. %, зокрема від 75 до 97 мас. % та особливо від 80 до 95 мас. %, у перерахунку на загальну кількість еквівалентів глюкози.

Одержану на стадії а2) водну рідину (1), що містить декстрин, згідно з винаходом використовують на стадії b) для ферментативного одержання бажаної органічної сполуки. З цією метою рідину (1), що містить декстрин, піддають ферментації, де вона служить для культивування використовуваного у ферментації мікроорганізму. При цьому одержують відповідну органічну сполуку як леткий або нелеткий продукт метаболізму мікроорганізмів.

Як правило, одержану водну рідину (1)), що містить декстрин, без використання окремого резервуару для оцукрювання безпосередньо використовують у ферментації відповідно до стадії b). Зазвичай рідину (1), що містить декстрин, охолоджують до температури ферментації, як правило, 32-37 °C, перед її введенням у ферментацію.

Водну рідину (1), що містить декстрин, перед початком ферментації, в разі потреби, можна стерилізувати, причому мікроорганізми зазвичай вбивають термічним або хімічним способом. З цією метою водну рідину (1), що містить декстрин, зазвичай нагрівають до температури вище 80 °C. Знищення або лізис клітин можна здійснювати безпосередньо перед ферментацією. З цією метою всю рідину (1), що містить декстрин, піддають

лізису або знищенню. Це можна здійснювати термічним, механічним або хімічним способом. Однак в рамках способу згідно з винаходом здійснення стадії стерилізації перед ферментацією, як описано вище, виявилось непотрібним, навпаки, більш вигідним виявилось нездійснення такої стадії стерилізації. Таки чином переважна форма виконання стосується способу, при якому одержане на стадії а2) середовище (1) безпосередньо, тобто без попередньої стерилізації, вводять у ферментацію.

В ході ферментації відбувається розщеплення декстринів згідно з винаходом в основному без додавання оцукрювальних ферментів. При цьому декстрини розщеплюються мікроорганізмом, скоріше за все після їх гідролізу штам-характерними оцукрювальними ферментами, наприклад, штам-характерними глюкоамілазами. Гіпотетично оцукрювання розріджених компонентів крохмалю відбувається паралельно із розщепленням цукру, зокрема моносахариди, глюкози, мікроорганізмами.

Тому відповідно до переважної форми виконання використовуваний для ферментації мікроорганізм вибирають із мікроорганізмів, що експресують або виробляють ферменти, які гідролізують декстрини до моносахаридів, зокрема із таких, що виробляють або експресують глюкоамілази. Такі мікроорганізми відомі фахівцям або можуть бути виявлені за допомогою звичайних експериментів наприклад, способами скрінінгу, наприклад, скрінінгом на виявлення глюкоамілази, наприклад, шляхом протягування мікроорганізму у дослідженні в хитній колбі та подальшим дослідженням ферментативної активності глюкоамілази, або скрінінгом за допомогою праймерів/зондів відповідно до описаних у прикладах методів скрінінгу, а також шляхом проведення пошуку у банках даних ферментів, таких як:

- Brenda [Schomburg I., Chang A., Hofmann O., Ebeling C, Ehrentreich F., Schomburg D. BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic Information. Trends Biochem Sci. 2002Jan;27(1):54-6.],

- Swissprot [Boeckmann B., Bairoch A., Apweiler R., Blatter M.-C, Estreicher A., Gasteiger E., Martin M.J., Michoud K., O'Donovan C, Phan I., Pilboud S., Schneider M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its Supplement TrEMBL in 2003 Nucleic Acids Res. 31:365-370(2003)],

- ERGO-WIT [Overbeek R, Larsen N, Walunas T, D'Souza M, Pusch G, Selkov E Jr, Liolios K, Joukov V, Kaznadzey D, Anderson I, Bhattacharyya A, Burd H, Gardner W, Hanke P, Kapatral V, Mikhailova N, Vasieva O, Osterman A, Vonstein V, Fonstein M, Ivanova N, Kyrpides N. The ERGO(TM) genome analysis and discovery System. Nucleic Acids Res 2003 Jan 1 ;31 (1): 164-71; Overbeek R, Larsen N, Pusch GD, D'Souza M, Selkov E Jr, Kyrpides N, Fonstein M, Maltsev N, Selkov E. WIT: integrated System for high-throughput genome sequence analysis and metabolic reconstruction. Nucleic Acids Research, 2000; Vol. 28, No. 1: 123-125],

- CAZY [Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes Server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>; Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes:

an integrated database approach. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", HJ. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12] та

- PIR [Cathy H. Wu, Lai-Su L. Yeh, Hongzhan Huang, Leslie Arminski, Jorge Cas-tro-Alvear, Yongxing Chen, Zhang-Zhi 洪, Robert S. Ledley Panagiotis Kourtesis, Baris E. Suzek, C R. Vinayaka, Jian Zhang, and Winona C Barker. The Protein Information Resource. Nucleic Acids Research, 31:345-347, 2003.] описаними у прикладах методами.

Прикладами придатних мікроорганізмів з активністю глюкоамілази є *Agrobacterium tumefaciens*, *Arxula adeninivorans*, *Ashbya gossypii*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus kawachi*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus shirousami*, *Aspergillus terreus*, *Athelia rolfsii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Beta vulgaris*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia fungorum*, *Burkholderia pseudomallei*, *Candida albicans*, *Candida antarctica*, *Candida glabrata*, *Candida tsukubaensis*, *Caulobacter crescentus*, *Cephalosporium charticola*, *Cephalosporium eichhorniae*, *Ceratocystis paradoxa*, *Chaetomium thermophilum*, *Chlorobium tepidum*, *Chromobacterium violaceum*, *Cladosporium resinae*, *Clostridium* sp., *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Coniophora puteana*, *Corticium rolfsii*, *Corynebacterium glutamicum*, *Cryptococcus neoformans*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces occidentalis*, *Emericella nidulans*, *Endomyces* sp., *Endomycopsis fibuligera*, *Fusarium venenatum*, *Haloarcula marismortui*, *Hormoconis resinae*, *Humicola grisea*, *Humicola lanuginosa*, *Hypocrea lixii*, *Kluyveromyces lactis*, *Lentinula edodes*, *Lipomyces kononenkoae*, *Magnaporthe grisea*, *Mesorhizobium loti*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Monascus rubiginosus*, *Monascus* sp., *Mucor rouxianus*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Myrothecium* sp., *Neurospora crassa*, *Nostoc punctiforme*, *Oryza sativa*, *Paecilomyces variotii*, *Panaeus japonicus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium oxalicum*, *Picrophilus torridus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia metallidurans*, *Rana japonica*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus* sp., *Rhodococcus* sp., *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Shewanella oneidensis*, *Sphingomonas aromaticivorans*,

*Streptomyces coelicolor*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, *Talaromyces emersonii*, *Termitomyces clypeatus*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Thermoascus crustaceus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoproteus tenax*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei* та *Trichosporon adeninovorans*.

Якщо використовувати для ферментації мікроорганізми експресують штам-характерні глюкоамілази, то значення pH ферментаційного середовища встановлюють в оптимальному діапазоні значень зони активності використовуваної глюкоамілази, переважно у діапазоні від 3,5 до 6,0. Часто значення pH встановлюють в оптимальному для ферментації діапазоні, що виходить за межі зазначеного діапазону, наприклад, від 6,0 до 8,0. Це загалом може виявитися вигідним для ферментації, незважаючи на обмежену активність глюкоамілаз у цьому діапазоні значень pH, або необхідним, враховуючи встановлювані умови ферментації, які зокрема встановлюють, виходячи із відповідного мікроорганізму. Оптимальний для ферментації діапазон значень pH може бути визначений фахівцями за допомогою звичайних експериментів.

З метою досягнення значного перетворення декстрину, введеного через середовище (1) у ферментаційне середовище, ферментаційне середовище зазвичай протягом часу від 2 до 72 годин або, в разі потреби, довше, наприклад, від 2 до 96 годин, зокрема від 5 до 48 годин тримають при встановленій температурі. Зазвичай одержані шляхом гідролізу із декстринів моносахариди, зокрема глюкоза, швидко розщеплюються мікроорганізмами, так що високі концентрації моносахаридів або відповідно глюкози, як правило, виявити не вдається.

Ферментацію можна здійснювати відомими фахівцям способами. З цією метою бажаний мікроорганізм культивують, як правило, у рідкому середовищі, одержаному описаним тут способом.

Спосіб ферментації можна здійснювати як періодично, так і напівперіодично (періодично, включаючи проміжний етап збирання), причому перевагу надають напівперіодичному способу здійснення.

Так, наприклад, одержане способом згідно з винаходом середовище (1), в разі потреби, разом зі звичайним джерелом цукру, тобто здатними до розщеплення моно-, ди- та/або олігосахаридами, або середовищами, що містять здатні до розщеплення моно-, ди- та/або олігосахариди, в разі потреби, після розрідження водою та додавання звичайних компонентів середовища, таких як буферні розчини, живильні солі, джерела азоту, наприклад, сульфат амонію, карбамід і т.п., комплексні компоненти живильного середовища, що містять амінокислоти, такі як дріжджові екстракти, пептони, CSL та подібні, можна інокулювати бажаним мікроорганізмом та розмножувати його в умовах ферментації, доки концентрація мікроорганізмів не досягне бажаного для ферментації постійного значення. При цьому декстрини, що містяться у ферментаційному середовищі, розщеплюють, в результаті

чого утворюється бажаний продукт метаболізму (так званий періодичний метод або періодична фаза).

При здійсненні напівперіодичного методу відразу після періодичної фази, наприклад, якщо загальна концентрація цукру падає нижче певного значення, то середовище (1) безперервно або періодично додають у ферментаційне середовище.

Типовим методом здійснення способу згідно з винаходом є періодичний метод, що включає такі стадії:

b1) культивування здатного до перевироблення органічної сполуки мікроорганізму у водному ферментаційному середовищі (2); та

b2) додавання середовища (1), що містить декстрин, в разі потреби, разом зі звичайним джерелом цукру до ферментаційного середовища (2), в якому декстрини, що входять до складу середовища (1), розщеплюються мікроорганізмами, які перевиробляють органічну сполуку, в разі потреби, після попереднього оцукрювання.

На стадії b1) спочатку у звичайному цукровмісному середовищі, як правило, у розчині глюкози, або у рідкому середовищі (1) згідно з винаходом або у суміші із (1) та звичайного джерела цукру шляхом розрідження водною рідиною, зокрема водою, встановлюють придатну концентрацію цукру, після чого додають звичайні для ферментації компоненти середовища, такі як буферні розчини, живильні солі, джерела азоту, наприклад, сульфат амонію, карбамід і т.п., комплексні компоненти живильного середовища, що містять амінокислоти, такі як дріжджові екстракти, пептони, CSL та подібні. При цьому співвідношення кількості цукру та рідини, як правило, переважно вибирають таким чином, що загальна концентрація моносахаридів у ферментаційному середовищі (2) становить менше 6 мас. %, наприклад, від > 0 до 5 мас. %, визначених як еквіваленти глюкози, у перерахунку на загальну вагу ферментаційного середовища (2). Приготоване таким чином цукровмісне реакційне середовище інокулюють бажаним мікроорганізмом, після чого мікроорганізм розмножують у реакційному середовищі (ферментаційному середовищі (2)) в умовах ферментації, доки концентрація мікроорганізмів не досягне бажаного для ферментації постійного значення. При цьому цукор, що міститься у ферментаційному середовищі (2), розщеплюють, в результаті чого утворюється бажаний продукт метаболізму.

У наступній напівперіодичній фазі процес ферментації підтримують шляхом додавання середовища (1), що містить декстрин, у ферментаційне середовище (2), а перевироблений мікроорганізмом продукт їх метаболізму насичується у ферментаційному розчині, причому насичення може відбуватися як всередині клітин, так і поза їх межами. При цьому об'ємне співвідношення доданого середовища (1) і іншого існуючого середовища, що містить мікроорганізми (ферментаційного середовища (2)), становить загалом від приблизно 1 : 10 до 10 : 1 та переважно від приблизно 1 : 5 до 5 : 1, зокрема від 1 : 1 до 5 : 1. Зокрема за допомогою швидкості подачі середовища (1) можна регулювати концентрацію цукру у ферментаційному

середовищі (2). Як правило, швидкість подачі встановлюють такою, щоб загальна концентрація цукру, тобто сума олігосахаридів та моносахаридів, не перевищувала показник у 30 мас. %, зокрема 20 мас. %. Переважно концентрація моносахариду у ферментаційному розчині становить від > 0 мас. % до приблизно 5 мас. % та зокрема не перевищує значення 3 мас. %.

Відповідно до переважної форми виконання ферментаційне середовище (2) на стадії b1) (тобто тут композиційне середовище) містить в основному середовище (1), що містить декстрин, здатні до перевироблення органічної сполуки мікроорганізми, компоненти середовища, такі як буферні розчини, живильні солі, джерела азоту, наприклад, сульфат амонію, карбамід і т.п., комплексні компоненти живильного середовища, що містять амінокислоти, такі як дріжджові екстракти, пептони, CSL та подібні, та, в разі потреби, воду для розрідження. Крім того середовище (1), що містить декстрин, в разі потреби, розріджують до бажаного вмісту декстрину, наприклад, від 15 до 30 мас. %, визначеного як еквіваленти глюкози, у перерахунку на загальну вагу середовища (1), що містить декстрин, після чого його безпосередньо використовують для приготування ферментаційного середовища (2) (композиційного середовища).

Вміст декстрину у використовуваному для підтримання ферментації середовищі, що містить декстрин, відповідно до стадії b2) становить зазвичай перевищує або, наприклад, знаходиться в межах зазначених вище діапазонів, щоб мінімізувати розрідження ферментаційного середовища (2).

Переважно діють таким чином: одержують середовище (1), що містить декстрин, з високим вмістом декстринів, наприклад, щонайменше 30 мас. %, особливо щонайменше 40 мас. % та зокрема щонайменше 50 мас. %, визначених як еквіваленти глюкози, у перерахунку на загальну вагу середовища (1), що містить декстрин. Після цього це середовище (1) з одного боку відповідно до стадії b1) після розрідження водою використовують для приготування композиційного середовища (ферментаційного середовища (2)), а з іншого боку відповідно до стадії b2) - для додавання у ферментаційне середовище (2).

При використанні середовища (1), що містить декстрин, можуть бути ферментативно одержані леткі та нелеткі, зокрема нелеткі продукти метаболізму мікроорганізмів, що містять щонайменше 3 атоми вуглецю або щонайменше 2 атоми вуглецю та 1 атом азоту.

При цьому під нелеткими продуктами розуміють такі сполуки, які не можуть бути одержані дистиляцією із ферментаційного розчину у нерозкладеному вигляді. Температура кипіння цих сполук при нормальному тиску, як правило, вище температури кипіння води, часто вище 150 °C та зокрема вище 200 °C. Зазвичай при цьому йдеться про сполуки, які в нормальних умовах (298 K, 101,3 кПа) існують у твердому стані.

Однак можливо також використовувати водне середовище (1), що містить декстрин, в процесі ферментації для одержання нелетких продуктів

метаболізму мікроорганізмів, температура плавлення яких при нормальному тиску нижче температури кипіння води та/або масляної речовини.

Поняття нелеткі продукти метаболізму мікроорганізмів включає зокрема органічні, моно-, ди- та трикарбонові кислоти, що містять переважно від 3 до 10 атомів вуглецю та, в разі потреби, 1 або кілька, наприклад, 1, 2, 3 або 4 гідроксильні групи, наприклад, винна, ітаконова, бурштинова, пропіонова, молочна, 3-гідроксипропіонова, фумарова, малеїнова, 2,5-фурандикарбонова, глутарова, левулінова, глюконова, акотинова та діамінопімелінова кислота, лимонна кислота; білкові та небілкові амінокислоти, наприклад, лізин, глутамат, метіонін, фенілаланін, аспарагінова кислота, триптофан та треонін; пуринова та піримідинова основи; нуклеозиди та нуклеотиди, наприклад, нікотинамідаденідинуклеотид (НАД) та аденозин-5'-монофосфат (АМФ); ліпіди; начисені та ненасичені жирні кислоти, що містять переважно від 10 до 22 атомів вуглецю, наприклад,  $\gamma$ -ліноленова, дигомо- $\gamma$ -ліноленова, арахідонова, ейкозапентаєнова та докозагексаєнова кислота; діюли, що містять переважно від 3 до 8 атомів вуглецю, наприклад, пропандіол та бутандіол; багатоатомні спирти, що містять 3 або більше, наприклад, 3, 4, 5 або 6 ОН-груп, наприклад, гліцерин, сорбіт, маніт, ксиліт та арабініт; довголанцюгові спирти, що містять щонайменше 4 атоми вуглецю, наприклад, від 4 до 22 атомів вуглецю, такі як бутанол; вуглеводи, наприклад, галауронова кислота та трегалоза; ароматичні сполуки, наприклад, ароматичні аміни, ванілін та індіго; вітаміни та провітаміни, наприклад, аскорбінова кислота, вітамін В<sub>6</sub>, вітамін В<sub>12</sub> та рибофлавін, кофактори та так звані нутріцевічні засоби; протеїни, наприклад, ферменти, такі як амілази, пектинази, кислі, гібридні або нейтральні целюлози, естерази, такі як ліпази, панкреази, протеази, ксиланази та оксидоредуктази, такі як лаказа, каталаза та пероксидаза, глюканаз, фітази; каротиноїди, наприклад, лікопін,  $\beta$ -каротин, атаксантин, зеаксантин та кантаксантин; кетони, що містять переважно від 3 до 10 атомів вуглецю та, в разі потреби, 1 або більше гідроксильних груп, наприклад, ацетон та ацетоїн; лактони, наприклад,  $\gamma$ -бутиролактон, циклодекстрини, біополімери, наприклад, полігідроксиацетат, поліестери, наприклад, полілактид, полісахариди, поліізопреноїди, поліаміди; а також вихідні сполуки та похідні зазначених сполук. Інші сполуки, які можуть представляти собою нелеткі продукти метаболізму мікроорганізмів, описані під редакцією Gutcho в Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973), ISBN: 0818805086.

Поняття "кофактор" включає небілкові сполуки, які є необхідними для ініціювання нормальної ферментативної активності. Ці сполуки можуть бути органічними або неорганічними; молекули кофактора згідно з винаходом є переважно органічними. Прикладами таких молекул є НАД та нікотинамідаденідинуклеотидфосфат (НАДФ); вихідною сполукою цих кофакторів є ніацин.

Поняття "нутріцевічний засіб" включає харчові добавки, які є корисними для рослин та тварин, зокрема людей. Прикладами таких молекул є

вітаміни, антиоксиданти та певні ліпіди, наприклад, багаторазово ненасичені жирні кислоти.

Зокрема одержані продукти метаболізму вибирають із групи, що включає ферменти, амінокислоти, вітаміни, дисахариди, аліфатичні моно- та дикарбонові кислоти, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, аліфатичні гідроксикарбонові кислоти, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, кетони, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, алканолі, що містять від 4 до 10 атомів вуглецю, та алкандіюли, що містять від 3 до 10, зокрема від 3 до 8 атомів вуглецю.

Фахівцям зрозуміло, що одержані таким ферментативним способом сполуки існують відповідно у виробленій використовуваними мікроорганізмами енантиомерній формі (якщо у даному випадку можливі різні енантиомери). Так, наприклад, із амінокислот, як правило, одержують відповідний L-енантиомер.

Використовувані у ферментації мікроорганізми відомим чином класифікують за їх відповідними продуктами метаболізму, як зокрема зазначено нижче. Вони можуть бути природного походження або генетично модифіковані. В таблиці А наведені приклади придатних мікроорганізмів та способів ферментації.

Таблиця А:

Речовина	Мікроорганізм	Посилання
Винна кислота	<i>Lactobacilli</i> , (напр. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> )	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 ma 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Ітаконова кислота	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus itaconicus</i>	Jakubowska, Smith u. Pateman (видавн.), <i>Genetics and Physiology of Aspergillus</i> , London: Academic Press 1977; Miall, in Rose (видавн.), <i>Economic Microbiology</i> , том 2, стор. 47-119, London: Academic Press 1978; US 3044941 (1962).
Бурштинова кислота	<i>Actinobacillus</i> sp. 130Z, <i>Anaerobiospirillum succiniproducens</i> , <i>Actinobacillus succinogenes</i> , <i>E. coli</i>	Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 498 -504 (1976); EP 249773 (1987), Erf.: Lemme u. Datta; US 5504004 (1996), Erf.: Guettler, Jain u. Soni; Arch. Microbiol. 167, 332 -342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK, <i>Actinobacillus succinogenes</i> sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan;49 Pt 1:207-16; US 5,723,322, US 5,573,931, US 5,521,075, WO 99/06532, US 5,869,301, US 5,770,435
Гідроксипропіонова кислота	<i>Lactobacillus delbrückii</i> , <i>L. leichmannii</i> або <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	RÖMPP Online Version 2.2
Пропіонова кислота	<i>Propionibacterium</i> , нап. <i>P. arabinosum</i> , <i>P. schermanii</i> , <i>P. freudenreichii</i> , <i>Clostridium</i>	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 ma 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Діамінопімелінова кислота	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Лимонна кислота	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus wentii</i>	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331 -373 (1986); Food Bio-technol. 7, 221-234 (1993); 10, 13-27 (1996)
Аконітова кислота	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus wentii</i>	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331 -373 (1986); Food Biotechnol. 7, 221-234 (1993); 10, 13-27 (1996); Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995
Яблучна кислота	<i>Aspergilli</i> , нап. <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Corynebacterium</i>	US 3,063,910
Глюконова кислота	<i>Aspergilli</i> , нап. <i>A. niger</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)

Масляна кислота	<i>Clostridium</i> (напр. <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. butyricum</i> )	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995
Молочна кислота	<i>Lactobacillus</i> , напр. <i>L. delbrückii</i> , <i>L. leichmannii</i>	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995
Лізин	<i>Corynebacterium glu-tamicum</i>	Ikeda, M.: <i>Amino Acid Production Process</i> (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35
Глютамат	<i>Corynebacterium glu-tamicum</i>	Ikeda, M.: <i>Amino Acid Production Process</i> (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35
Метионін	<i>Corynebacterium glu-tamicum</i>	Ikeda, M.: <i>Amino Acid Production Process</i> (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35
Фенілаланін	<i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>E.coli</i>	Trends Biotechnol. 3, 64 -68 (1985); J. Ferment. Bioeng. 70, 253-260 (1990)
Треонін	<i>E. coli</i>	Ikeda, M.: <i>Amino Acid Production Process</i> (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35
Аспарагінова кислота	<i>E. coli</i>	Ikeda, M.: <i>Amino Acid Production Process</i> (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35 + цитовані там літ. джер., Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Пурінова та піримідинова основи	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Нікотинамідаденін-динуклеотид (НАД)	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Аденозин-5'-монофосфат (АМФ)	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
γ-ліноленова кислота	<i>Mucor</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Aspergillus</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: <i>Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications</i> (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: <i>Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production</i> . Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-11111102-205855)

Маніт	<i>Aspergillus candida</i> , <i>Torulopsis mannifaciens</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Арабіт	<i>Saccharomyces rouxii</i> , <i>S. mellis</i> , <i>Sclerotium glucanicum</i> , <i>Pichia ohmeri</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Ксиліт	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Гіалуринонова кислота	<i>Streptococcus</i> sp.	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995
Трегалоза	<i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Pleurotus</i> genus, <i>Filobasidium floriforme</i>	JP 05099974, JP 06311891, FR 2671099, EP 0555540, JP 3053791, Miyazaki, J.-I., Miyagawa, K.-I., Sugiyama, Y.: <i>Trehalose Accumulation by Basidiomycetous Yeast, Filobasidium floriforme</i> . Journal of Fermentation and Bioengineering 81, (1996) 4, 315-319.
Аскорбінова кислота	<i>Gluconobacter melanogenes</i>	RÖMPP Online Version 2.2
Вітамін В <sub>12</sub>	<i>Propionibacterium</i> spp., <i>Pseudomonas denitrificans</i>	Chem. Ber. 1994, 923 -927; RÖMPP Online Version 2.2
Рибофлавін	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Ashbya gossypii</i>	WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664; Fujioka, K.: <i>New biotechnology for riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) and character of this riboflavin</i> . Fragrance Journal (2003), 31(3), 44-48
Вітамін В <sub>6</sub>	<i>Rhizobium tropici</i> , <i>R. meliloti</i>	EP0765939
Фермент	<i>Aspergilli</i> (напр. <i>Aspergillus niger</i> A. oryzae), <i>Trichoderma</i> , <i>E.coli</i> , <i>Hansenula</i> або <i>Pichia</i> (напр. <i>Pichia pastoris</i> ), <i>Bacillus</i> (напр. <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> ) і ін.	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Зеаксантин	<i>Dunaliella salina</i>	Jin et al (2003) <i>Biotech.Bioeng.</i> 81:115-124
Кантаксантин	<i>Brevibacterium</i>	Nellis et al (1991) <i>J Appl Bacteriol</i> 70:181-191
Лікопін	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Candida utilis</i>	WO 03/056028, EP 01/201762, WO 01/12832, WO 00/77234, Miura et al (1998) <i>Appl Environ Microbiol</i> 64:1226-1229

Дигомо-γ-ліноленова кислота	<i>Mortierella</i> , <i>Candido-bolus</i> , <i>Saprolegnia</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: <i>Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications</i> (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: <i>Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production</i> . Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-11111102-205855)
Арахідонова кислота	<i>Mortierella</i> , <i>Phytium</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: <i>Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications</i> (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: <i>Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production</i> . Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-11111102-205855)
Ейкозапентаєнова кислота	<i>Mortierella</i> , <i>Phytium</i> spp., <i>Rhodospseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: <i>Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications</i> (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: <i>Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production</i> . Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-11111102-205855).
Докозагексаєнова кислота	<i>Thraustochytrium</i> , <i>Entomophthora</i> spp., <i>Rhodospseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: <i>Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications</i> (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: <i>Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production</i> . Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-11111102-205855)
Пропандіол	<i>E. coli</i>	DE 3924423, US 440379, WO 9635799, US 5164309
Бутандіол	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973); H. G. SCHLEGEL and H. W. JANNASCH, 1981; Afschar et al.: <i>Mikrobielle Produktion von 2,3-Butandiol</i> . CIT 64 (6), 2004, 570-571
Бутанол	<i>Clostridium</i> (напр. <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. propionicum</i> )	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Гліцерин	Дріжджі, <i>Saccharomyces rouxii</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)

β-каротин	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Candida utilis</i>	Kim S., Seo W., Park Y., <i>Enhanced production of beta-carotene from Blakeslea trispora with Span 20</i> , Bio-technology Letters, Vol 19, No 6, 1997, 561-562; Mantouridou F., Roukas T.: <i>Effect of the aeration rate and agitation speed on beta-carotene production and mor-phology of Blakeslea trispora in a stirred tank reactor: mathematical modelling</i> , Biochemical Engineering Journal 10 (2002), 123-135; WO 93/20183; WO 98/03480, Miura et al (1998) <i>Appl Environ Microbiol</i> 64:1226-1229
Астаксантин	<i>Phaffia rhodozyma</i> , <i>Candida utilis</i>	US 5,599,711; WO 91/02060, Miura et al (1998) <i>Appl Environ Microbiol</i> 64:1226-1229
Полігідроксиалканоати, поліестери	<i>Escherchia coli</i> , <i>Alcaligenes latus</i> і ін.	S. Y. Lee, <i>Plastic Bacteria Progress and Prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria</i> , Tibtech, Vo. 14, (1996), S. 431-438, Steinbüchel, 2003; Steinbüchel (Hg.), <i>Biopolymers</i> , 1. еуд., 2003, Wiley-VCH, Weinheim та цитовані там літературні джерела
Полісахариди	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L. dextranicum</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> і ін.	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Поліізопреноїди	<i>Lactarius</i> sp., <i>Hygrophorus</i> sp., <i>Russula</i> sp.	Steinbüchel (Hg.), <i>Biopolymers</i> , 1 еуд., 2003, Wiley-VCH, Weinheim та цитовані там літературні джерела
Ацетон	<i>Clostridium</i> (напр. <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. propionicum</i> )	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Ацетонін	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Lengele, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G.: <i>Hrs., Biology of the Procarvates</i> , Thieme, Stuttgart (1999), S.307; RÖMPP Online-Edition
Ванілін	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Amycolatopsis</i> sp.	Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbüchel, A. <i>Biotechnological production of vanillin</i> , Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 296-314 (2001)
Турингенсин	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Jian-Zhong Jong et al.: <i>Fed-batch culture of Bacillus thuringiensis for thuringiensin production in a tower type bioreactor</i> . Biotechnology and Bioengineering 48 (3) (2004), 207-213

Полікетиди	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Sorangium cellulosum</i>	Kirst: Fermentation-derived compounds as a source for new products. <i>Pure &amp; Appl. Chem.</i> 70 (2), (1998), 335-338; Zirkle et al.: Heterologous production of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A of <i>Sorangium cellulosum</i> So ce26 in <i>Streptomyces lividans</i> . <i>Microbiology</i> 150 (8), (2004), 2761-74
Гіберелінова кислота	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Hollmann et al.: Extraktiv-Fermentation von <i>Gibberellinsäure</i> mit <i>Gibberella fujikuroi</i> . <i>CIT</i> 7 (1995), 892-895
Індіго	<i>Escherichia coli</i> JB 102	Berry, A., Dodge, T.C., Pepsin, M., Weyler, W.: Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. <i>Journal of Industrial Microbiology &amp; Biotechnology</i> 28 (2002), 127-133

Відповідно до переважних форм виконання винаходу одержана органічна сполука вибрана із моно-, ди- та трикарбонних кислот, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю та, в разі потреби, містять гідроксильні групи, протейногенних та непротейногенних амінокислот, пуринових основ, піримідинових основ, нуклеозидів, нуклеотидів, ліпідів; насичених та ненасичених жирних кислот; діолів, що містять від 4 до 10 атомів вуглецю, багатоатомних спиртів, що містять 3 або більше гідроксильних груп, довголанцюгових спиртів, що містять щонайменше 4 атоми вуглецю, вуглеводів, ароматичних сполук, вітамінів, провітамінів, кофакторів, нутріцевтичних засобів, протейнів, каротиноїдів, кетонів, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, лактонів, біополімерів та циклодекстринів.

Перша переважна форма виконання винаходу стосується застосування одержаного згідно з винаходом рідкого середовища, що містить цукор, для ферментативного одержання ферментів, таких як фітази, ксиланози або глюканози.

Друга переважна форма виконання винаходу стосується застосування одержаного згідно з винаходом рідкого середовища, що містить цукор, для ферментативного одержання амінокислот, таких як лізин, меіонін, треонін.

Інша переважна форма виконання винаходу стосується застосування одержаного згідно з винаходом рідкого середовища, що містить цукор, для ферментативного одержання вітамінів, таких як пантотенова кислота та рибофлавін, вихідних сполук та продуктів реакції.

Особливо переважна форма виконання винаходу стосується ферментативного одержання таких сполук: моно-, ди- та трикарбонних кислот, зокрема аліфатичних моно-, ди- та дикарбонних кислот, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, таких як пропіонова, фумарова, бурштинова, ітаконова, лимонна та диметилмалонова кислота,

- аліфатичних гідроксикарбонних кислот, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, таких як молочна та 3-гідроксипропіонова кислота;

- довголанцюгових алканолів, як зазначено вище, зокрема алканолів, що містять від 4 до 10 атомів вуглецю, таких як бутанол;

- діолів, як зазначено вище, зокрема алкандіолів, що містять від 3 до 10 та зокрема від 3 до 8 атомів вуглецю, таких як пропандіол;

- кетонів, як зазначено вище, зокрема кетонів, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, таких як ацетон, та

- вуглеводів, як зазначено вище, зокрема дисахаридів, таких як трегалоза.

Відповідно до іншої особливо переважної форми виконання під виробленим в ході ферментації продуктом метаболізму мікроорганізмів розуміють полігідроксиалканоати, такі як полі-3-гідроксибутират, та співполіестери інших органічних гідроксикарбонних кислот, таких як 3-гідроксивалеріанова кислота, 4-гідроксимасляна кислота та інші, описані у працях під редакцією Steinbüchel, наприклад, довголанцюгові гідроксикарбонні кислоти, такі як 3-гідроксиоктанова кислота, 3-гідроксидеканова кислота та 3-гідрокситетрадеканова кислота, а також їх суміші. Для здійснення ферментації можуть бути застосовані аналогічні умови та методи, які описані у випадку інших джерел вуглецю, наприклад, в S. Y. Lee, *Plastic Bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria*, *Tibtech*, том 14, (1996), стор. 431-438.

Тому в переважній формі виконання винаходу використовувані у ферментації мікроорганізми вибирають із природних або рекомбінантних мікроорганізмів, що перевиробляють щонайменше один із таких продуктів метаболізму:

- ферменти, такі як фітаза, ксиланаз або глюканаз, зокрема фітаза;

- амінокислоти, такі як лізин треонін або метіонін, зокрема лізин та метіонін;

- вітаміни, такі як пантотенова кислота та рибофлавін; вихідні сполуки та/або продукти реакції;

- дисахариди, такі як трегалоза;

- аліфатичні моно- та дикарбонні кислоти, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, такі як пропіонова, фумарова, бурштинова, ітаконова, лимонна та диметилмалонова кислота;

- полігідроксиалканоати, такі як полі-3-гідроксибутират, та співполіестери 3-гідроксимасляної кислоти;

- аліфатичні гідроксикарбонні кислоти, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, такі як молочна та 3-гідроксипропіонова кислота;

- кетони, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, такі як ацетон;

- алканолі, що містять від 4 до 10 атомів вуглецю, такі як бутанол; та

- алкандіолі, до містять від 3 до 8 атомів вуглецю, такі як пропандіол.

Придатні мікроорганізми зазвичай вибирають з родів *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ashbya*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Rhizopus* та *Clostridium*, зокрема штамів *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* oder *Alcaligenes latius*, *Anaerobiospirillum succiniproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus leichmannii*, *Propionibacterium arabinosum*, *Propionibacterium schermanii*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Rhizopus arrhizus* та *Rhizopus oryzae*.

У одній з переважних форм виконання винаходу під використовуваним у ферментації мікроорганізмом розуміють штам з роду *Corynebacterium*, зокрема штам *Corynebacterium glutamicum*. Пере-



важно мова йде про штам з роду *Corynebacterium*, зокрема *Corynebacterium glutamicum*, який перевиробляє амінокислоту, а саме лізин, метіонін або глутамат.

У іншій переважній формі виконання винаходу під використанням у ферментації мікроорганізмів розуміють штам з роду *Escherichia*, зокрема штам *Escherichia coli*. Переважно мова йде про штам з роду *Escherichia*, зокрема *Escherichia coli*, який перевиробляє амінокислоту, а саме лізин, метіонін або треонін.

У спеціальній переважній формі виконання винаходу під одержаним в ході ферментації продуктом метаболізму мікроорганізмів розуміють лізин. Для здійснення ферментації можуть бути застосовані аналогічні умови та методи здійснення, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в Pfefferle et al., як зазначено вище, та US 3,708,395. Загалом використовують як безперервний, так і періодичний спосіб виконання, переважно безперервний спосіб виконання.

У іншій особливо переважній формі виконання винаходу під одержаним в ході ферментації продуктом метаболізму мікроорганізмів розуміють метіонін. Для здійснення ферментації можуть бути застосовані аналогічні умови та методи здійснення, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в WO 03/087386 та WO 03/100072.

У ще одній особливо переважній формі виконання винаходу під одержаним в ході ферментації продуктом метаболізму мікроорганізмів розуміють пантотенову кислоту. Для здійснення ферментації можуть бути застосовані аналогічні умови та методи здійснення, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в WO 01/021772.

У іншій особливо переважній формі виконання винаходу під одержаним в ході ферментації продуктом метаболізму мікроорганізмів розуміють рибофлавін. Для здійснення ферментації можуть бути застосовані аналогічні умови та методи здійснення, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664 та Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. *Fragrance Journal* (2003), 31(3), 44-48.

Відповідно до ще однієї особливо переважної форми виконання винаходу під одержаним в ході ферментації продуктом метаболізму мікроорганізмів розуміють фумарову кислоту. Для здійснення ферментації можуть бути застосовані аналогічні умови та методи здійснення, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в Rhodes et al, Production of Fumaric Acid in 20-L Fermentors, *Applied Microbiology*, 1962, 10 (1), 9-15.

Відповідно до іншої особливо переважної форми виконання винаходу під одержаним в ході ферментації продуктом метаболізму мікроорганізмів розуміють бурштинову кислоту. Для здійснення ферментації можуть бути застосовані аналогічні умови та методи здійснення, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 498-504 (1976); EP 249773 (1987), винах.: Lemme u. Datta; US 5504004 (1996), винах.: Guettler, Jain u. Soni; Arch. Microbiol. 167, 332 -342

(1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Jan; 49 Pt 1:207-16; US 5,723,322, US 5,573,931, US 5,521,075, WO 99/06532, US 5,869,301 або US 5,770,435.

Відповідно до ще однієї особливо переважної форми виконання винаходу під одержаним в ході ферментації продуктом метаболізму мікроорганізмів розуміють фітазу. Для здійснення ферментації можуть бути застосовані аналогічні умови та методи здійснення, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в WO 98/55599.

В ході ферментації одержують ферментаційний розчин, який поряд із бажаним продуктом метаболізму мікроорганізмів містить в основному одержану в ході ферментації біомасу, що включає нерозщеплені компоненти розрідженого розчину крохмалю та зокрема тверді компоненти крохмалювмісної сировини, що не містять крохмаль, наприклад, волокна та невикористаний цукор, а також невикористані буферні та живильні солі. Це рідке середовище в даній заявці позначають як ферментаційний розчин, причому поняття ферментаційний розчин включає також додане середовище (1), що містить декстрин, в якому відбувається часткове або неповне ферментативне перетворення цукру, що входить до складу середовища, тобто часткове або неповне розщеплення використовуваного цукру (наприклад, моно- та дисахаридів) мікроорганізмами.

Перед виділенням чи збідненням продукту метаболізму мікроорганізмів або виділенням летких компонентів ферментаційного розчину, в разі потреби, стадію стерилізації здійснюють описаним вище способом.

Спеціальна форма виконання винаходу стосується способу, згідно з яким щонайменше один продукт метаболізму мікроорганізмів збіднюють або виділяють із ферментаційного розчину. Після цього видаляють леткі компоненти ферментаційного розчину, при цьому одержують тверду або напівтверду композицію, що містить білок. Більш детальний опис методу здійснення такого способу та одержаної при цьому композиції, що містить білок, є предметом заявки WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) даного заявника, на яку існують численні посилання щодо інших деталей.

Збіднення або виділення продукту метаболізму із ферментаційного розчину здійснюють, як правило, таким чином, що в результаті збіднюють або виділяють щонайменше один продукт метаболізму із ферментаційного розчину так, що вміст цього продукту метаболізму у залишковому ферментаційному розчині становить щонайбільше 20 мас. %, зокрема щонайбільше 10 мас. %, переважно щонайбільше 5 мас. % та особливо переважно щонайбільше 2,5 мас. %, відповідно у перерахунку на загальну вагу залишкового ферментаційного розчину.

Збіднення або виділення продуктів органічного синтезу (тобто продукту метаболізму мікроорганізмів) із ферментаційного розчину можна здійснювати в одну або кілька стадій. Важливою стадією при цьому є виділення твердих компонентів із фе-



рментаційного розчину. Це можна здійснювати до або після виділення цільового продукту. Як для виділення цільових речовин, так і для виділення твердих компонентів, тобто операція у твердій-рідкій фазі, фахівцям відомі звичайні методи, які включають також стадії грубого та тонкого подрібнення цільових речовин, а також методи приготування (описані наприклад, в Belter, P. A, *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology*, John Wiley & Sons (1988), та Ullmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5. видан, на CD-ROM, Wiley-VCH).

Виділення цільового продукту здійснюють переважно таким чином: спочатку із ферментаційного розчину видаляють тверді компоненти, наприклад, центрифугуванням або фільтруванням, а після цього із рідкої фази виділяють цільовий продукт, наприклад, кристалізацією, осадженням, адсорбцією або дистиляцією. Альтернативно цільовий продукт може бути виділений безпосередньо із ферментаційного розчину, наприклад, хроматографічними або екстракційними способами. Як хроматографічний спосіб зокрема слід назвати спосіб іонообмінної хроматографії, при якому цільовий продукт може бути селективно виділений на хроматографічній колонці. У цьому випадку виділення твердих речовин із залишкового ферментаційного розчину здійснюють, наприклад, декантуванням, випаровуванням та/або сушкою.

У випадку летких або масляних сполук, як правило, необхідним є контролювання максимальних температур в ході обробки, зокрема в ході сушки. Переважно ці сполуки можуть бути одержані також шляхом їх приготування у псевдотвердій формі на адсорбентах. Придатні для цього адсорбенти описані, наприклад, у заявці WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) даного заявника. Прикладами сполук, що можуть бути одержані таким чином, є  $\gamma$ -ліноленова кислота, дигомо- $\gamma$ -ліноленова кислота, арахідонова, ейкозапентаєнова та докозагексаєнова кислота, а також пропіонова кислота, молочна кислота, пропандіол, бутанол та ацетон. Навіть ці сполуки у вигляді псевдотвердої препаративної форми в рамках даного винаходу вважаються нелеткими продуктами метаболізму мікроорганізмів у твердій формі.

Інша спеціальна форма виконання (II) винаходу стосується способу, згідно з яким леткі компоненти ферментаційного розчину у значній кількості видаляють без попереднього збіднення або виділення нелеткого продукту метаболізму мікроорганізмів та, в разі потреби, без попереднього виділення твердих компонентів, при цьому одержують тверду композицію нелеткого продукту метаболізму мікроорганізмів. Більш детальний опис методу здійснення такого способу наведений у PCT/EP2006/066057 (пріоритетна заявка на патент DE 10 2005 042 541.0) даного заявника.

Це означає, що після виділення летких компонентів залишається твердий або напівтвердий залишок, який, в разі потреби, шляхом додавання твердих речовин може бути переведений у твердий продукт. Як правило це означає, що леткі компоненти необхідно видалять до залишкової вологості не більше 30 мас. %, часто не більше 20 мас.

% та зокрема не більше 15 мас. %. Зазвичай леткі компоненти ферментаційного розчину переважно видаляють із цього розчину до залишкової вологості від 0,2 до 30 мас. %, зокрема від 1 до 20 мас. %, особливо переважно від 2 до 15 мас. % та найбільш переважно від 5 до 15 мас. %, у перерахунку на визначену після сушки загальну вагу твердих компонентів. Залишкова вологість може бути визначена звичайними відомими фахівцям способами, наприклад, термогравіметричним аналізом (Hemminger et al., *Methoden der thermischen Analyse*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989).

Одержання нелеткого (нелетких) продукту (продуктів) метаболізму у твердій формі із ферментаційного розчину можна здійснювати в одну, дві або більше стадій, зокрема в одну або дві стадії. Як правило, щонайменше одна, переважно кінцева стадія одержання продукту метаболізму у твердій формі включає стадію сушки.

При здійсненні способу в одну стадію леткі компоненти ферментаційного розчину, в разі потреби, після описаного вище попереднього виділення, видаляють до досягнення бажаної залишкової вологості.

При здійсненні способу в дві або більше стадій спочатку ферментаційний розчин концентрують, наприклад, (мікро-, ультра-)фільтруванням або термічним способом шляхом випаровування частини летких компонентів. Вміст видалених на цій стадії летких компонентів становить, як правило, від 10 до 80 мас. % та зокрема від 20 до 70 мас. %, у перерахунку на загальну вагу летких компонентів ферментаційного розчину. На одній або кількох кінцевих стадіях залишкові леткі компоненти ферментаційного розчину видаляють до досягнення бажаної залишкової вологості.

Відповідно до цієї форми виконання (II) виділення летких компонентів рідкого середовища здійснюють в основному без попереднього збіднення або взагалі без виділення цільового продукту. В результаті цього при виділенні летких компонентів ферментаційного розчину нелеткий продукт метаболізму в основному не виділяється разом із цими компонентами, він залишається разом із частиною, зазвичай основною кількістю та зокрема загальною кількістю інших твердих компонентів ферментаційного розчину в одержаному таким чином залишку. В результаті цього незначні кількості бажаного нелеткого продукту метаболізму мікроорганізмів, як правило максимум 20 мас. %, наприклад, від 0,1 до 20 мас. %, переважно не більше 10, зокрема не більше 5 мас. %, особливо переважно максимум 2,5 мас. % та найбільш переважно максимум 1 мас. %, у перерахунку на загальну суху вагу продукту метаболізму, при виділенні летких компонентів ферментаційного розчину можуть бути виділені разом з ними. Відповідно до найбільш переважної форми виконання винаходу бажаний нелеткий продукт метаболізму мікроорганізмів у кількості до щонайменше 90 мас. %, зокрема щонайменше 95 мас. %, переважно 99 мас. % та особливо переважно приблизно 100 мас. %, відповідно у перерахунку на загальну суху вагу продукту метаболізму, як тверда речовина залишається у суміші разом з одержаною після

видалення летких компонентів частиною або загальною кількістю твердих компонентів ферментаційного середовища.

За бажанням перед видаленням летких компонентів із ферментаційного розчину можна виділяти частину, наприклад, від 5 до 80 мас. % та зокрема від 30 до 70 мас. % твердих компонентів, що не містять крохмалю, наприклад, центрифугуванням або фільтруванням. В разі потреби, таке попереднє виділення здійснюють з метою видалення найбільш грубих частинок твердої речовини, які не містять або містять лише незначну кількість нелеткого продукту метаболізму мікроорганізмів. Для попереднього фільтрування можуть бути застосовані звичайні відомі фахівцям способи, наприклад, при використанні сит з великими отворами, сіток, листів з отворами та подібних пристроїв. В разі потреби, виділення грубих частинок твердої речовини можна здійснювати також у відцентровому сепараторі. Використовувані при цьому апаратури, такі як декантатори, центрифуги, седиментатори та сепаратори, також відомі фахівцям. Таким чином одержують твердий або напівтвердий, наприклад, пастоподібний залишок, який містить нелеткий продукт метаболізму та нелеткі, як правило, тверді компоненти крохмалювмісної сировини, що не містять крохмалю, або щонайменше їх великі частини, часто у кількості щонайменше 90 мас. % або у загальній кількості твердих компонентів, що не містять крохмалю.

Шляхом додавання допоміжних речовин для одержання композиції, таких як носії та матеріали для нанесення покриття, зв'язувальних засобів, а також інших добавок властивості висушеного продукту метаболізму, що існує разом із твердими компонентами ферментації, можна цілеспрямовано відомими способами покращувати з огляду на різні параметри, такі як вміст активної речовини, розмір зерна, розмір частинок, схильність до пилоутворення, гігроскопічність, стабільність, зокрема стабільність при зберіганні, колір, запах, текучість, схильність до агломерації, електростатичне зарядження, світло- та термочутливість, механічна стабільність та здатність до редиспергування.

До зазвичай використовуваних допоміжних речовин для одержання композиції належать, наприклад, зв'язувальні засоби, носії, засоби, що покращують припудрювання/текучість, а також фарбувальні пігменти, біоциди, диспергатори, знепінювачі, засоби, що регулюють в'язкість, кислоти, луки, антиоксиданти, стабілізатори ферментів, інгібітори ферментів, адсорбати, жири, жирні кислоти, масла або їх суміші. Такі допоміжні речовини для одержання композиції переважно використовують при здійсненні способів приготування та сушки, наприклад, розпилювальної сушки, сушки у псевдозрідженому шарі та сублимаційної сушки, як допоміжні засоби для сушки. Інші деталі описані в РСТ/ЕР2006/066057 (пріоритетна заявка DE 10 2005 042 541.0).

Вміст зазначених вище добавок та, в разі потреби, інших добавок, таких як матеріали для нанесення покриття, можна варіювати у широкому діапазоні залежно від спеціальних вимог відповідного продукту метаболізму, а також залежно від влас-

тливостей використовуваних додаткових речовин, цей вміст становить, наприклад, від 0,1 до 80 мас. % та зокрема від 1 до 30 мас. %, відповідно у перерахунку на загальну вагу готового продукту або суміші речовин.

Додавання допоміжних речовин для одержання композиції можна здійснювати до, в ході або після обробки ферментаційного розчину (позначеного також як композиція продукту або суміш твердих речовин) та зокрема в процесі сушки. Додавання допоміжних речовин для одержання композиції перед обробкою ферментаційного розчину або відповідно продукту метаболізму може бути особливо вигідним для покращення здатності до переробки використовуваних речовин або продуктів. Допоміжні речовини для одержання композиції можна додавати як в продукт метаболізму, що одержаний в твердій формі, так і у розчин або суспензію, що його містить, наприклад, після завершення ферментації безпосередньо у ферментаційний розчин або в одержаний у ході обробки розчин чи суспензію перед кінцевою стадією сушки.

Так, наприклад, допоміжні речовини можна примішувати у суспензію продукту метаболізму мікроорганізмів; така суспензія може бути нанесена на матеріал носія, наприклад, шляхом розпилювання або підмішування. Додавання допоміжних речовин для одержання композиції в ході сушки може, наприклад, мати важливе значення у випадку розпилення розчину або суспензії, що містить продукт метаболізму. Зокрема додавання допоміжних речовин для одержання композиції оболонки або покриття/шарів покриття на висушені частинки. Як після сушки, так і після можливої стадії нанесення покриття у продукт можна додавати інші допоміжні засоби.

Видалення летких компонентів із ферментаційного розчину здійснюють відомими способами відділення твердих фаз від летких, включаючи спосіб фільтрації та спосіб випаровування летких компонентів рідких фаз. Такі способи, які можуть включати також стадії грубого очищення цільових продуктів, а також стадії компонування, описані, наприклад в Belter, P. A, *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology*, John Wiley & Sons (1988), та в Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5. видан, на CD-ROM, Wiley-VCH. Використовувані в рамках приготування продукту або обробки після завершення ферментації відомі фахівцям способи, установки, допоміжні речовини або загальні та спеціальні форми виконання описані також в ЕР 1038 527, ЕР 0648 076, ЕР 835613, ЕР 0219 276, ЕР 0394 022, ЕР 0547 422, ЕР 1088 486, WO 98/55599, ЕР 0758 018 та WO 92/12645.

В першому варіанті цієї форми виконання (II) нелеткий продукт метаболізму мікроорганізмів, якщо він розчинений у рідкій фазі, переводять із рідкої фази у тверду, наприклад, кристалізацією або садженням. Потім здійснюють виділення нелетких твердих компонентів, включаючи продукт метаболізму, наприклад, центрифугуванням, декантуванням або фільтруванням. Подібним чином можна виділяти і масляні продукти метаболізму,

причому відповідні масляні продукти ферментації переводять у тверду форму шляхом додавання адсорбентів, наприклад, кремнієвої кислоти, силікагелів, глини, крейди та активованого вугілля.

В другому варіанті цієї форми виконання леткі компоненти виділяють випаровуванням. Випаровування можна здійснювати відомими способами. Прикладами придатних способів випаровування летких компонентів є розпилювальна сушка, сушка або агломерація у псевдозрідженому шарі, сублімаційна сушка, пневматична та контактна сушка, а також сушка екструзією. Можливою є також комбінація зазначених способів зі способами формування, такими як екструдкування, гранулювання або прилювання. У випадку цих останніх способів використовують переважно частково або майже повністю попередньо висушені суміші речовин, що містять продукт метаболізму.

Відповідно до переважної форми виконання процес виділення летких компонентів ферментаційного розчину включає спосіб розпилювальної сушки або спосіб сушки у псевдозрідженому шарі, включаючи гранулювання у псевдозрідженому шарі. З цією метою ферментаційний розчин, в разі потреби, після попереднього видалення грубих частинок твердої речовини, що не містять або містять лише незначну кількість нелеткого продукту метаболізму мікроорганізмів, подають в одну або кілька установок для розпилювальної сушки або сушки у псевдозрідженому шарі. Транспортування або подачу ферментаційного розчину, що містить тверді речовини, здійснюють за допомогою звичайних транспортувальних установок для рідин, що містять тверді речовини, наприклад, насосів, таких як ексцентрикові шнекові насоси (наприклад, фірми Delasco PCM) або насоси високого тиску (наприклад, фірми LEWA Herbert Ott GmbH).

Здійснення ферментації з використанням цукровмісного рідкого середовища згідно з винаходом може відбуватися також таким чином:

i) із одержаного на стадії a2) середовища (1), що містить декстрин, а також тверді компоненти крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль, виділяють частину продукту, не більше 50 мас. %, наприклад, від 5 до 45 мас. %, у перерахунку на загальну вагу, а залишкову кількість, в разі потреби, разом з іншим джерелом цукру, як зазначено вище, піддають ферментації для одержання першого продукту (A) метаболізму, наприклад, нелеткого продукту (A) метаболізму у твердій формі або леткого продукту (A) метаболізму; та

ii) цю частину, в разі потреби, після попереднього повного або часткового виділення твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль, піддають ферментації для одержання другого продукту (B) метаболізму, що ідентичний продукту (A) метаболізму або відрізняється від нього.

У випадку виділення твердих компонентів, що не містять крохмаль, відповідно до стадії (ii) вміст твердої речовини у залишковій кількості цукровмісного рідкого середовища переважно становить максимум 50 мас. %, зокрема максимум 30 мас. %, особливо переважно максимум 10 мас. % та найбільш переважно максимум 5 мас. %. Зокрема у

цьому випадку вигідно виділяти всі тверді речовини перед здійсненням ферментації для одержання другого продукту (B) метаболізму.

Цей спосіб дозволяє в окремій ферментації відповідно до стадії (ii) використовувати мікроорганізми, у випадку яких необхідно дотримуватися мінімальних вимог, наприклад, щодо швидкості переносу кисню. Як такі використовувані в окремій ферментації на стадії (ii) мікроорганізми придатними є, наприклад, *Bacillus species*, переважно *Bacillus subtilis*. До сполук, які виробляють такі мікроорганізми в окремій ферментації, належать зокрема вітаміни, кофактори та нутрієвтичні засоби, пуринова та піримідинова основи, нуклеозиди та нуклеотиди, ліпіди, насичені та ненасичені жирні кислоти, ароматичні сполуки, протеїни, каротиноїди, зокрема вітаміни, кофактори та нутрієвтичні засоби, протеїни та каротиноїди, особливо переважно рибофлавін та пантотенат кальцію.

Переважна форма виконання цього способу стосується паралельного одержання ідентичних продуктів (A) та (B) метаболізму двома окремими ферментаціями. Це є особливо вигідним у тому випадку, коли для різних цілей застосування одного і того ж продукту метаболізму ставлять різні вимоги щодо його чистоти. Таким чином перший продукт (A) метаболізму, наприклад, використовуваний як добавка до кормів амінокислоту, наприклад, лізин, метіонін, треонін або глутамат, одержують при застосуванні ферментаційного розчину, що містить тверду речовину, а ідентичний другий продукт (B) метаболізму, наприклад, ту ж саму використовувану як харчова добавка амінокислоту, одержують при застосуванні ферментаційного розчину, збідненого твердими речовинами на стадії (ii). Завдяки такому повному або частковому виділенню твердих компонентів, що не містять крохмаль, можна зменшити витрати на очищення при обробці продукту метаболізму, сфера використання якого вимагає високої чистоти, наприклад, у випадку харчової добавки.

Відповідно до іншої переважної форми виконання цього способу можна, наприклад, діяти, як описано вище. При цьому здійснюють переважно масштабну ферментацію для одержання продуктів A метаболізму, наприклад, амінокислот, таких як лізин, метіонін, глутамат або треонін, лимонної кислоти або етанолу, наприклад, згідно з описаними в WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) або PCT/EP2006/066057 (пріоритетна заявка DE 10 2005 042 541.0) способами або відповідно до відомих з рівня техніки способів, описаних для ферментативного одержання біоетанолу. Відповідно до стадії i) виділяють частину одержаного на стадії a2) середовища (1) або його суміші з іншим джерелом цукру. Виділену відповідно до стадії i) частину на стадії ii) можна повністю або частково очищувати від твердих речовин звичайними способами, наприклад, центрифугуванням або фільтруванням, залежно від вимог ферментації для одержання продукту B. Одержане таким чином, в разі потреби, повністю або частково звільнене від твердих речовин середовище (1) відповідно до стадії ii), в разі потреби, разом з іншим джерелом цукру, як зазначено вище, піддають ферментації

для одержання продукту В метаболізму. Виділений на стадії i) потік твердих речовин переважно повторно використовують у потоці середовища (1) при здійсненні ферментації у великих масштабах.

Якщо одержаним в ході ферментації у великих масштабах продуктом (А) метаболізму мікроорганізмів є етанол, то концентрація олігосахаридів у одержаному на стадії ii) середовищі (1) є такою, яку зазвичай використовують при ферментативному одержанні етанолу (біоетанолу), наприклад, від 20 до 33 мас. %. Здійснення методу виділення твердих речовин відповідно до стадії ii) в даному випадку також залежить від вимог ферментації для одержання відповідно продукту В метаболізму.

Відповідно до переважної форми виконання описаного вище способу під виробленим мікроорганізми в процесі ферментації продуктом В метаболізму розуміють рибофлавін. Для здійснення ферментації можуть бути застосовані аналогічні умови та методи, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664 та Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. *Fragrance Journal* (2003), 31(3), 44-48.

Для виконання цього варіанту способу здійснюють переважно масштабну ферментацію для одержання продуктів А метаболізму, наприклад, амінокислот, таких як лізин, глутамат, треонін або метіонін, або лимонної кислоти чи етанолу, як описано вище. Відповідно до стадії i) частину одержаного на стадії a2) середовища (1) вивантажують та відповідно до стадії ii) звичайними способами, наприклад, центрифугуванням або фільтруванням, повністю або частково звільнюють від твердих речовин. Одержане при цьому в основному повністю або частково звільнене від твердих речовин середовище (1) після додавання іншого джерела цукру на стадії ii) піддають ферментації з метою одержання продукту В метаболізму, в даному випадку рибофлавіну. Виділений відповідно до стадії ii) потік твердої речовини переважно повторно використовують у потоці середовища (1) при здійсненні ферментації у великих масштабах.

Одержаний таким чином ферментаційний розчин, що містить рибофлавін, можна піддавати подальшій обробці в аналогічних умовах та аналогічними методами, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в DE 4037441, EP 464582, EP 438767 та DE 3819745. Після лізису клітинної маси відбувається виділення кристалічного рибофлавіну переважно декантуванням. Крім того можливими є також і інші методи виділення твердої речовини, наприклад, фільтрування. Після цього рибофлавін сушать, переважно за допомогою розпилювальною сушарки або сушарки з псевдозрідженим шаром. Альтернативно одержану на стадії ii) ферментаційну суміш, що містить рибофлавін, можна піддавати подальшій обробці в аналогічних умовах та аналогічними методами, що були описані, наприклад, в EP 1048668 та EP 730034. Після пастеризації ферментаційний розчин центрифугують, а залишкові фракції, що міс-

ять тверду речовину, обробляють мінеральною кислотою. Утворений рибофлавін відфільтровують із водного кислого середовища, в разі потреби, промивають та після цього сушать.

Відповідно до іншої переважної форми виконання цього методу під одержаним в процесі ферментації продуктом В метаболізму мікроорганізмів мають на увазі пантотенову кислоту. Для здійснення ферментації можуть бути використані аналогічні умови та методи, які були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в WO 01/021772.

Для здійснення цього варіанту способу можна діяти, наприклад, так, як було описано вище у випадку рибофлавіну. Середовище (1), попередньо очищене, переважно в основному звільнене від твердих речовин відповідно до стадії ii), або його суміш з іншим джерелом цукру піддають ферментації відповідно до стадії ii) для одержання пантотенової кислоти. При цьому особливо вигідним є зменшення в'язкості порівняно із рідким середовищем, що містить тверду речовину. Виділений потік твердої речовини переважно повторно використовують у потоці цукорвмісного рідкого середовища при здійсненні ферментації у великих масштабах.

Одержаний на стадії ii) ферментаційний розчин, що містить пантотенову кислоту, можна піддавати подальшій обробці в аналогічних умовах та аналогічними методами, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в EP 1050219 та WO 01/83799. Після пастеризації всього ферментаційного розчину залишки твердої речовини видаляють, наприклад, центрифугуванням або фільтруванням. Продукт виділення твердої речовини частково випаровують, в разі потреби, додають хлорид кальцію та сушать, зокрема піддають розпилювальній сушці.

Виділені тверді речовини можуть бути одержані в рамках паралельно здійснюваного у великих масштабах способу ферментації разом із відповідним бажаним продуктом метаболізму (А) мікроорганізмів.

Після сушки та/або приготування або відповідно складання у препаративну форму, що містить продукт, або композицію, що містить білок, можна додавати цілі або подрібнені зерна зернових культур, таких як переважно кукурудза, пшениця, ячмінь, просо, тритикале та/або жито.

Наведені нижче приклади унаочнюють деякі аспекти даного винаходу, в жодному разі не обмежуючи обсяг його охорони.

#### Приклади

##### I. Подрібнення крохмаловмісної сировини

Використовувані нижче подрібнені матеріали одержують таким чином. Всі зерна кукурудзи повністю подрібнюють у роторному млині. При використанні різних відбійних пристроїв, подрібнювальних плит або просіювальних елементів одержують три різні помоли. Нижче в таблиці 1 наведені результати ситового аналізу подрібненого матеріалу, одержані за допомогою лабораторного вібраційного сита (вібраційна аналітична машина: Retsch Vibrotronic типу VE1; час просіювання: 5 хв; амплітуда: 1,5 мм).

Таблиця 1

Номер експерименту	T 70/03	T 71/03	T 72/03
< 2 мм / %	99,4	100	100
< 0,8 мм / %	66	100	99
< 0,63 мм / %	58,6	98,5	91
< 0,315 мм/%	48,8	89	65
<0,1 мм/%		25	9,6
< 0,04 мм / %		8	3,2
Загальна кількість подрібненого матеріалу	20 кг	11,45 кг	13,75 кг

## II. Ферментативне розрідження та оцукрювання крохмалю

### II.1. Без додавання фітази на стадії оцукрювання

#### II.1a) Ферментативне розрідження крохмалю

Із 320 г сухої подрібненої кукурудзяної муки (T71/03) при постійному перемішуванні готують суспензію 480 г води та додають 310 мг хлориду кальцію. Перемішування продовжують протягом всього процесу. Після встановлення значення pH = 6,5 за допомогою  $H_2SO_4$  та нагрівання до 35 °C додають 2,4 г термамілу 120L типу L (фірми Novozymes A/S). Через 40 хвилин реакційну суміш нагрівають до температури 86,5 °C, при цьому значення pH, в разі потреби, доводять до попередньо встановленого значення за допомогою NaOH. Протягом 30 хвилин додають наступні 400 г сухої подрібненої кукурудзяної муки (T71/03), причому температуру підвищують до 91 °C. Реакційну суміш тримають при такій температурі протягом приблизно 100 хвилин. Потім додають інші 2,4 г термамілу 120L та температуру тримають протягом приблизно 100 хвилин. Хід процесу розрідження контролюють протягом усього дослідження реакцією крохмалю на йод. Після цього температуру підвищують до 100 °C та реакційну суміш наступні 20 хвилин кип'ятять. На цей момент часу крохмаль більше не виявляють. Реактор охолоджують до 35 °C.

### II.3 Інші методики для ферментативного розрідження та оцукрювання крохмалю

#### II.3a) Кукурудзяна мука

360 г деіонізованої води поміщають у реакційну посудину. Додають 1,54 мг концентрованого розчину  $CaCl_2$  (100 г  $CaCl_2 \times 2 H_2O$  / л) до досягнення кінцевої концентрації приблизно 70 м.ч.  $Ca^{2+}$  у суміші. При постійному перемішуванні у воду повільно засипають 240 г кукурудзяної муки. Після встановлення значення pH = 6,5 за допомогою 50 мас. %-ного водного розчину NaOH додають 4,0 мл (= 2 мас. % суміші фермент/суха маса) термамілу 120 L типу L (фірми Novozymes A/S). Потім суміш швидко нагрівають до 85 °C. При цьому необхідно постійно контролювати значення pH та, в разі потреби, доводити до необхідного значення.

Після досягнення кінцевої температури розпочинають додавання іншої кількості муки, спочатку 50 г муки. Додатково у суміш додають 0,13 мл концентрованого розчину  $CaCl_2$  для підтримання концентрації  $Ca^{2+}$  біля позначки 70 м.ч.. В ході дода-

вання температуру постійно підтримують при 85 °C. Чекають щонайменше 10 хвилин для забезпечення повної реакції перед додаванням іншої порції (50 г муки та 0,13 мл концентрованого розчину  $CaCl_2$ ). Після додавання двох порцій додають 1,67 мл термамілу; потім додають дві інші порції (відповідно 50 г муки та 0,13 мл концентрованого розчину  $CaCl_2$ ). Вміст сухої маси досягає 55 мас. %. Після додавання температуру підвищують до 100 °C та суміш кип'ятять протягом 10 хвилин.

Беруть пробу та охолоджують її до кімнатної температури. Після розрідження проби деіонізованою водою (приблизно 1:10) додають краплю концентрованого розчину Люголя (суміш 5 г йоду та 10 г йодиду калію на літр). При цьому темно-синє забарвлення свідчить про вміст залишкового крохмалю; проба зафарбовується у коричневий колір, коли крохмаль повністю гідролізований. Якщо результати тесту вказують на залишковий вміст крохмалю, то температуру знову знижують до 85 °C та постійно тримають біля цієї позначки. Додають ще 1,67 мл термамілу, доки реакція крохмалю на йод не буде негативною.

II.3d) Житня мука (включаючи попередню обробку целюлазою/геміцелюлозою) 360 г деіонізованої води поміщають у реакційну посудину. При постійному перемішуванні повільно засипають 155 г житньої муки у воду. Температуру постійно тримають біля позначки 50 °C. Після встановлення значення pH = 5,5 за допомогою 50 мас. %-ного водного розчину NaOH додають 3,21 мл (= 2,5 мас. % суміші фермент/суха маса) Visczyme L (фірми Novozymes A/S). Через 30 хвилин знову додають 50 г муки; через наступні 30 хвилин ще раз додають 40 г муки. Через 30 хвилин після останнього додавання можна розпочинати розрідження.

Додають 1,7 мл концентрованого розчину  $CaCl_2$  (100 г  $CaCl_2 \times 2 H_2O$  / л). Після встановлення значення pH = 6,5 за допомогою 50 мас. %-ного водного розчину NaOH додають 5,0 мл (= 2 мас. % суміші фермент/суха маса) термамілу 120 L типу L (фірми Novozymes A/S). Потім суміш швидко нагрівають до 85 °C. При цьому постійно контролюють значення pH та, в разі потреби, доводять його до необхідного значення.

Після досягнення кінцевої температури розпочинають додавання іншої кількості муки, спочатку 60 г муки. Додатково у суміш додають 0,13 мл концентрованого розчину  $CaCl_2$  для підтримання кон-

центрації  $\text{Ca}^{2+}$  біля позначки 70 м.ч.. В ході додавання температуру постійно підтримують при 85 °С. Чекають щонайменше 10 хвилин для забезпечення повної реакції перед додаванням іншої порції (40 г муки та 0,1 мл концентрованого розчину  $\text{CaCl}_2$ ). Додають 1,1 мл термамилу; потім додають ще одну порцію (40 г муки та 0,1 мл концентрованого розчину  $\text{CaCl}_2$ ). Вміст сухої маси досягає 55 мас. %. Після додавання температуру підвищують до 100 °С та суміш кип'ятять протягом 10 хвилин.

Беруть пробу та охолоджують її до кімнатної температури. Після розрідження проби деіонізованою водою (приблизно 1:10) додають краплю концентрованого розчину Люголя (суміш 5 г йоду та 10 г йодиду калію на літр). При цьому темно-синє забарвлення свідчить про вміст залишкового крохмалю; проба зафарбовується у коричневий колір, коли крохмаль повністю гідролізований. Якщо результати тесту вказують на залишковий вміст крохмалю, то температуру знову знижують до 85 °С та постійно тримають біля цієї позначки. Додають ще 1,1 мл термамилу, доки реакція крохмалю на йод не буде негативною.

II.3с) Пшенична мука (включаючи попередню обробку ксиланазою) 360 г деіонізованої води поміщають у реакційну посудину. Воду нагрівають до 55 °С та за допомогою 50 мас. %-ного водного розчину  $\text{NaOH}$  встановлюють значення  $\text{pH} = 6,0$ . Після встановлення температури та значення  $\text{pH}$  додають 3,21 мл (= 2,5 мас. % суміші фермент/суха маса) Shearzyme 500L (фірми Novozymes A/S). При постійному перемішуванні у розчин повільно засипають 155 г пшеничної муки. Тримують постійне значення температури та значення  $\text{pH}$ . Через 30 хвилин розпочинають додавання додаткової кількості муки, спочатку додають 55 г муки. Через наступні 30 хвилин додають ще 50 г муки; ще через 30 хвилин ще раз додають 40 г муки. Через 30 хвилин після останнього додавання можна розпочинати розрідження. Розрідження здійснюють, як описано у пункті II.3b.

### III. Штам ATCC13032 $\text{lysC}^{\text{fibr}}$

В деяких наведених нижче прикладах використовують модифікований штам *Corynebacterium glutamicum*, описаний під назвою ATCC13032  $\text{lysC}^{\text{fibr}}$  у WO 05/059144.

IV: Ідентифікація штамів, які експерсують / виробляють глюकोамілазу

IVa) Скрінінг у генних банках даних Пошук штамів, що виробляють глюкоамілазу

1. Глюкоамілазу (1,4-альфа-D-глюкан глюкогідролазу) класифікують під таким номером ЕС: ЕС 3.2.1.3 [1].

2. Пошук із ключовим словом ЕС 3.2.1.3 був проведений в таких банках даних: Brenda, Swissprot, ERGO-WIT, CAZY та PIR, при цьому був одержаний відповідно перелік протеїнів, що мають номер ЕС 3.2.1.3.

3. Відповідні листи з результатами об'єднують, фільтрують за таксономічною ієрархією Archaea (археї), Bacteria (бактерії) та Fungi (гриби) і сортують за назвою видів.

4. Види, які відповідають вимогам нітрування пункту 3 та для яких у щонайменше одному із вказаних у пункті 2 банків даних був знайдений запис

із ключовим словом „глюкоамілаза”, з великою вірогідністю здатні виробляти глюкоамілазу. Зокрема при цьому йдеться про такі види:

*Agrobacterium tumefaciens*, *Arxula adenivorans*, *Ashbya gossypii*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus kawachi*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus shiroyami*, *Aspergillus terreus*, *Athelia rolfsii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearotheophilus*, *Beta vulgaris*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia fungorum*, *Burkholderia pseudomallei*, *Candida albicans*, *Candida antarctica*, *Candida glabrata*, *Candida tsukubaensis*, *Caulobacter crescentus*, *Cephalosporium charticola*, *Cephalosporium eichhorniae*, *Ceratocystis paradoxa*, *Chaetomium thermophilum*, *Chlorobium tepidum*, *Chromobacterium violaceum*, *Cladosporium resinae*, *Clostridium* sp., *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Coniophora puteana*, *Corticium rolfsii*, *Corynebacterium glutamicum*, *Cryptococcus neoformans*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces occidentalis*, *Emericella nidulans*, *Endomyces* sp., *Endomycopsis fibuligera*, *Fusarium venenatum*, *Haloarcula marismortui*, *Hormoconis resinae*, *Humicola grisea*, *Humicola lanuginosa*, *Hypocrea lixii*, *Kluyveromyces lactis*, *Lentinula edodes*, *Lipomyces kononenkoae*, *Magnaporthe grisea*, *Mesorhizobium loti*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Monascus rubiginosus*, *Monascus* sp., *Mucor rouxianus*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Myrothecium* sp., *Neurospora crassa*, *Nostoc punctiforme*, *Oryza sativa*, *Paecilomyces variotii*, *Pennaeus japonicus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium oxalicum*, *Picrophilus torridus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia metallidurans*, *Rana japonica*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus* sp., *Rhodococcus* sp., *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Shewanella oneidensis*, *Sphingomonas aromaticivorans*, *Streptomyces coelicolor*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, *Talaromyces emersonii*, *Termitomyces clypeatus*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Thermoascus crustaceus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoproteus tenax*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei* та *Trichosporon adenivorans*.

IVb) Скрінінг при здійсненні дослідження у хитній колбі з подальшим визначенням ферментативної активності

Різні мікроорганізми досліджують у хитній колбі на їх активність по відношенню до глюкоамілази. Як середовище при цьому може бути використане будь-яке звичайне середовище, придатне для росту організму, яке сприяє експресії глюкоамілази. Придатні середовища наявні у продажу або можуть бути одержані згідно з опублікованими інструкціями (наприклад, у каталогах American Type Culture Collection).

Так, наприклад, зазначене середовище як єдине джерело вуглецю може містити суміш олігомерів глюкози з різною довжиною ланцюга. Оскільки в умовах ферментації не відбувається ніякого термічного гідролізу олігосахаридів, у цьому середовищі можуть рости лише штами, що проявляють активність по відношенню до глюкоамілази та/або мальтази. Як субстрат придатним є, наприклад, Maldex 150 (фірми Amylum Group). Скрінінг здійснюють в різних умовах ферментації (значення pH, температура).

Щоб розрізнити активність по відношенню до глюкоамілази та мальтази, перед здійсненням експерименту аналізують олігосахаридний склад суміші, наприклад, за допомогою ВЕРХ. Так, наприклад, Maldex 150 має такий склад (див. таблицю 2):

Таблиця 2

Склад Maldex 150 (фірми Amylum Group)

Ступінь полімеризації	[%]
DP1	1,1
DP2	4,0
DP3	7,4
DP4	5,0
DP5	4,8
DP6	8,4
DP7	9,6
DP8	4,6
DP9	3,5
>DP9	51,6

Відповідно до цього аналізу готують контрольне середовище мальтози та глюкози. В такому випадку ріст та вироблення лізину в олігосахаридному середовищі, що виходять за межі значень контрольного середовища, чітко свідчать про активність по відношенню до глюкоамілази.

Альтернативною сумішю мальтодекстрину можуть бути також чисті мальтотетраози, мальтопентаози і т.д. як джерело вуглецю для здійснення скрінінгу. Після припинення культивування біомасу відцентрифугують, а надлишок фільтрують.

Прозорий залишок використовують у дослідженні активності глюкоамілази (CHEN et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 51, 175-181 (2005)). З цієї метою використовують реакційну суміш, що включає 0,2 мл 50 мМ буферного розчину ацетату ацетату натрію (pH = 5,0), який містить 0,5 % розчин крохмалю, та 0,2 мл надлишку. Через 10 хвилин здійснення реакції при 60 °C реакцію зупиняють 10-хвилинним кип'ятінням при 100 °C. Вивільнену кількість глюкози визначають за допо-

могою методу гликооксидази/пероксидази (Bergmayer und Bernt, 1974). При цьому одиницю активності глюкоамілази визначають як кількість ферменту, що у заданих умовах реакції із розчину крохмалю вивільнює 1 мкмоль глюкози за хвилину.

#### IVc) Скрінінг за допомогою праймерів/зондів

Альтернативним методом перевірки наявності в досліджуваному організмі послідовностей, що кодують глюкоамілазу, є скрінінг за допомогою праймерів або зондів, специфічних для цих послідовностей.

i) Виходячи із консервованих ділянок відомих генів глюкоамілази, конструюють зонд з метою ідентифікації та клонування ДНК-послідовностей різних організмів, які кодують поліпептиди з активністю глюкоамілази. Зокрема такі зонди можуть бути використані для гібридизації з геномними або кДНК бажаного організму та подальшого саузурн-блоттингу відповідно до стандартного методу з метою ідентифікації необхідного гену.

Інформацію про ідентифікацію послідовностей ДНК за допомогою гібридизації фахівці знаходять зокрема у посібнику „The DIG System Users Guide for Filter Hybridization” фірми Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) та під редакцією Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260).

ii) Виходячи із консервованих ділянок відомих генів глюкоамілази, синтезують PCR-праймери. Ці праймери використовують у PCR-реакції з ДНК досліджуваного організму. Якщо відповідні місця зв'язування для праймерів, тобто гени, що кодують глюкоамілазу, існують, то відповідні ампліфіковані олігонуклеотиди можуть бути ідентифіковані за допомогою послідовно здійснюваного гелелектрофорезу. Інформацію про ампліфікацію послідовностей ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (PCR) фахівці знаходять зокрема у посібнику під редакцією Gait: Oligonucleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) та під редакцією Newton та Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

#### Приклад 1

Розріджений гідролізат кукурудзяної муки застосовують у дослідженнях в хитних колбах при використанні *Corynebacterium glutamicum*.

#### 1) Розрідження

360 г деіонізованої води поміщають у реакційну посудину. При постійному перемішуванні у воду повільно засипають 240 г кукурудзяної муки. Після встановлення значення pH = 5,8 за допомогою 50 мас. %-ного водного розчину NaOH додають 4,0 мл (= 2 мас. % суміші фермент/суха маса) Liquezyme SC (фірми Novozymes A/S). Після цього суміш швидко нагрівають до 85 °C. При цьому постійно контролюють значення pH та, в разі потреби, доводять до необхідного значення.

Після досягнення кінцевої температури розпочинають додавання іншої кількості муки, спочатку 50 г муки. В ході додавання температуру постійно підтримують при 85 °C. Чекають щонайменше 10 хвилин для забезпечення повної реакції перед додаванням іншої порції (50 г) муки. Після додавання двох порцій додають 1,67 мл ліквізиму; по-

тім додають дві інші порції (відповідно 50 г муки). Вміст сухої маси досягає 55 мас. %. Після додавання температуру підвищують до 100 °C та суміш кип'ятять протягом 10 хвилин.

Беруть пробу та охолоджують її до кімнатної температури. Після розрідження проби деіонізованою водою (приблизно 1:10) додають краплю концентрованого розчину Люголя (суміш 5 г йоду та 10 г йодиду калію на літр). При цьому темно-синє забарвлення свідчить про вміст залишкового крохмалю; проба зафарбовується у коричневий колір, коли крохмаль повністю гідролізований. Суміш, результати дослідження на крохмаль якої є негативними, у гарячому стані подають у стерильний резервуар та після охолодження зберігають при 4 °C.

#### II) Ферментація з *Corynebacterium glutamicum* Штам

Використовують модифікований дикий тип, що містить аспартокіназу ATCC13032 *lysC<sup>fbr</sup>* із порушеним зворотнім зв'язком.

#### Одержання затравки

Клітини після нанесення на стерильний CM+CaAc-агар (склад: див. таблицю 3; 20 хвилин при 121 °C) протягом ночі інкубують при 30 °C. Потім клітини зіскоблюють з планшет та суспендують у соляному розчині. 25 мл середовища (див. таблицю 4) поміщають в 250 мл колбу Ерленмейера з двома дефлекторами та як затравку додають відповідно таку кількість одержаної таким чином суспензії клітин, щоб оптична густина OD<sub>610</sub> становила від 0,5 до 610 нм.

Таблиця 3

Склад CM+CaAc-агарових планшет

Концентрація	Компоненти
10,0г/л	D-глюкоза
2,5г/л	NaCl
2,0г/л	карбамід
5,0г/л	бактопетон (фірми Difco)
5,0г/л	дріжджовий екстракт (фірми Difco)
5,0г/л	м'ясний екстракт (фірми Difco)
20,0г/л	казамінові кислоти
20,0г/л	агар

#### Одержання ферментаційного розчину

Склад середовища колби наведений в таблиці 4. Дослідження здійснюють при триразовому вимірюванні.

Таблиця 4: Середовище у колбі

Гідролізат кукурудзяної муки	180 г/л
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 г/л
карбамід	5 г/л
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,113 г/л
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,138 г/л
ACES	52 г/л
MOPS	21 г/л
лимонна кислота x H <sub>2</sub> O	0,49 г/л
3,4-дигідроксибензойна кислота	3,08 мг/л
NaCl	2,5 г/л
KCl	1 г/л
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,3 г/л
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	25 мг/л
MnSO <sub>4</sub> x 4 - 6 H <sub>2</sub> O	5 мг/л
ZnCl <sub>2</sub>	10 мг/л
CaCl <sub>2</sub>	20 мг/л
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	150 мкг/л
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	100 мкг/л
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	100 мкг/л
NiSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	100 мкг/л

Гідролізат кукурудзяної муки	180 г/л
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	25 мкг/л
біотин (віт. H)	1050 мкг/л
тіамін x HCl (віт. B <sub>1</sub> )	2100 мкг/л
нікотинамід	2,5 мг/л
пантотенова кислота	125 мг/л
ціанокобаламін (віт. B <sub>12</sub> )	1 мкг/л
4-амінобензойна кислота (PABA; вит. H <sub>3</sub> )	600 мкг/л
фолієва кислота	1,1 мкг/л
піридоксин (віт. B <sub>6</sub> )	30 мкг/л
рибофлавін (віт. B <sub>2</sub> )	90 мкг/л
CSL	40 мл/л
pH*	6,85

\* значення встановлені з використанням розрідженого водного розчину NaOH

Після введення затравки колби протягом трьох днів інкубують при 30 °C при струшуванні (200 хв<sup>-1</sup>) у зволоженій хитній шафі. Після завершення ферментації визначають вміст лізину за допомогою ВЕРХ. Аналізи ВЕРХ здійснюють на РХ компанії Agilent серії 1100. Концентрацію амінокислот визначають ВЕРХ Agilent серії 1100. Передколонкова дериватизація орто-фталевим альдегідом дозволяє кількісно визначати утворені амінокислоти, розділення суміші амінокислот здійснюють на колонці Hypersil AA (Agilent).

Результати наведені нижче в таблиці 5.

Таблиця 5

Вироблення лізину (середні показники)

Час ферментації	Лізін [г/л]
45 год.	11,5
70 год.	12,8
контрольна група (45 год.)	11,1

#### Приклад 2

Розріджений гідролізат кукурудзяної муки використовують у дослідженнях в хитних колбах при додаванні *Aspergillus niger*.

#### I) Розрідження

Розрідження здійснюють, як описано у прикладі 1 пункт I).

#### II) Ферментація з *Aspergillus niger*

#### Штам

Штам-продуцент фітази *Aspergillus niger* з 6 копіями гену *phyA* із *Aspergillus ficuum* під контролем промотора *glaA* одержують аналогічно способу одержання NP505-7, детально описаному в WO 98/46772. Як контрольний зразок використовують штам з 3 модифікованими *glaA* ампліконами (ана-



логічно ISO505), однак без використання інтегрованих рН-експресійних касет.

Одержання затравки

В 20 мл попереднього живильного середовища (див. таблицю 6) в 100 мл колбі Ерленмейера з дефлектором як затравку відповідно вводять 100 мкл замороженої культури та протягом 24 годин інкубують при 34 °С при струшуванні (170 хв<sup>-1</sup>) у зволоженій хитній шафі.

Таблиця 6

Склад попереднього живильного середовища

Компонент	Концентрація
глюкоза	30,0 г/л
пептон із касеїну	10,0 г/л
дріжджовий екстракт	5,0 г/л
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 г/л
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 г/л
ZnCl <sub>2</sub>	30 мг/л
CaCl <sub>2</sub>	20 мг/л
MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	9 мг/л
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	3 мг/л
Tween 80	3,0 г/л
пеніцилін	50000 м.од./л
стрептоміцин	50 мг/л
pH*	5,5

\* значення встановлене з використанням розрідженої сірчаної кислоти

В 50 мл основного живильного середовища (див. таблицю 7) в 250 мл колбі Ерленмейера з дефлектором як затравку відповідно вводять 5 мл вихідної культури.

Одержання Ферментаційного розчину

Нижче в таблиці 7 зазначений склад середовища у колбі. Із кожного використовують дві колби.

Таблиця 7

Середовище у колбі	
Гідролізат кукурудзяної муки	200 г/л
пептон із касеїну	25,0 г/л
дріжджовий екстракт	12,5 г/л

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 г/л
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 г/л
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 г/л
ZnCl <sub>2</sub>	30 мг/л
CaCl <sub>2</sub>	20 мг/л
MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	9 мг/л
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	3 мг/л
пеніцилін	50000 м.од./л
стрептоміцин	50 мг/л
pH*	5,6

\* значення встановлене з використанням розрідженої сірчаної кислоти

Після введення затравки колби протягом 6 днів інкубують при 34 °С при струшуванні (170 хв<sup>-1</sup>) у зволоженій хитній шафі. Після завершення ферментації визначають активність фітази за допомогою фітинової кислоти як субстрату на відповідному рівні активності фітази (стандарт: 0,6 од./мл) в 250 мМ буферного розчину оцтової кислоти/ацетату натрію/Tween 20 (0,1 мас. %) при значенні pH = 5,5. Дослідження стандартизують для використання в мікротитрувальних планшетах (МТП). 10 мкл ферментного розчину змішують з 140 мкл 6,49 мМ фітатного розчину в 250 мМ буферного розчину ацетату натрію при значенні pH 5,5 (фітат: додеканатрієва сіль фітинової кислоти). Через годину інкубування при 37 °С реакцію зупиняють, додаючи такий же об'єм (150 мкл) три хлороцтової кислоти. Аліквотну частину цієї суміші (20 мкл) поміщають в 280 мкл розчину, що містить 0,32 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,27 мас. % молібдату амонію та 1,08 мас. % аскорбінової кислоти. Потім протягом 25 хвилин інкубують при 50 °С. Абсорбцію блакитного розчину визначають при 820 нм. Результати наведені в таблиці 8.

Таблиця 8

Активність фітази після припинення ферментації

Колби	Активність фітази [од. фіт/мл]
1	569
2	696
контрольна	393