



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95468 (13) C2

(51) МПК

C12P 19/14 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

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

(54) ФЕРМЕНТАТИВНЕ ОДЕРЖАННЯ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК

1

(21) а200808565

(22) 27.11.2006

(24) 10.08.2011

(86) PCT/EP2006/068928, 27.11.2006

(31) 10 2005 056 667.7

(32) 28.11.2005

(33) DE

(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.

(72) БОЙ МАТТИАС, DE, ФРЕЕР ШТЕФАН, DE

(73) БАСФ SE, DE

(56) JP A 2001309751, 06.11.2001

DE A1 3731293, 06.04.1989

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

i) подрібнення крохмалевмісної сировини при одержанні подрібненого матеріалу, який містить щонайменше частину твердих компонентів крохмалевмісної сировини, що не містять крохмаль,

ii) суспендування подрібненого матеріалу у водній рідині в такій кількості, при якій вміст сухої речовини у суспензії становить щонайменше 45 мас. %,

iii) гідроліз крохмалевмісного компонента в подрібненому матеріалі шляхом розрідження у присутності щонайменше одного ферменту здатного розріджувати крохмаль та, в разі потреби, подальшого оцукрювання, в результаті чого одержують водне середовище М, що містить гідролізовані крохмалевмісні компоненти сировини, та щонайменше частину твердих компонентів крохмалевмісної сировини, що не містять крохмаль,

iv) застосування одержаного на стадії iii) водного середовища М в процесі ферментації для культивування мікроорганізму, здатного перевиробляти органічну сполуку, причому на стадії iii) одержану на стадії ii) суспензію шляхом введення водяної пари у суспензію нагрівають до температури, вищої за температуру клейстеризації крохмалю, що входить до складу подрібненого матеріалу та як крохмалевмісну сировину використовують зерна зернових культур.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що нагрівання водяною парою здійснюють у нагрівачі з прямим нагрівом.

2

3. Спосіб за одним із пунктів 1 або 2, який відрізняється тим, що нагріту суспензію подрібненого матеріалу випаровуванням миттєвої дії охолоджують до температури, нижчої за температуру клейстеризації, а після цього здійснюють розрідження крохмалю в присутності ферменту, здатного розріджувати крохмаль.

4. Спосіб за будь-яким із пунктів 1 або 2, який відрізняється тим, що у суспензію перед нагріванням додають щонайменше один фермент, здатний розріджувати крохмаль.

5. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що гідроліз крохмалю включає стадію оцукрювання.

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

v) культивування здатного до перевироблення органічної сполуки мікроорганізму у водному ферментаційному середовищі F, що містить розщеплюваний цукор, та

vi) додавання середовища М у ферментаційне середовище F, причому гідролізовані компоненти крохмалю, що входять до складу середовища М, розщеплюються мікроорганізмами з утворенням органічної сполуки.

7. Спосіб за п. 6, який відрізняється тим, що ферментаційне середовище F на стадії v) містить в основному водне середовище М, мікроорганізми, що здатні до перевироблення органічної сполуки, живильні солі, звичайні допоміжні речовини та воду для розрідження.

8. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що подрібнений матеріал, який використовують на стадії ii), включає щонайменше 20 % твердих компонентів крохмалевмісної сировини, що не містять крохмаль.

9. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що як фермент, що розріджує крохмаль, використовують α -амілазу.

10. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який відрізняється тим, що одержану органічну сполуку вибирають із моно-, ди- та трикарбонових 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

(13) C2

(11) 95468

(19) UA

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.

11. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що використовуваний для ферментації мікроорганізм вибирають із природних або рекомбінантних мікроорганізмів, що перевиробляють щонайменше один із таких продуктів метаболізму: 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, алканоли, що містять від 4 до 10 атомів вуглецю, алкандіоли, що містять від 3 до 8 атомів вуглецю, та полігідроксиалканоати.

12. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що мікроорганізми вибирають із таких, що перевиробляють одну або кілька амінокислот.

13. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що мікроорганізми вибирають із таких, що перевиробляють одну або кілька аліфатичних моно- та дикарбонових кислот, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю.

14. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що мікроорганізми вибирають із таких, що перевиробляють один або кілька ферментів.

15. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що мікроорганізми вибирають із таких, що перевиробляють фітазу.

16. 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*.

17. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що мікроорганізми вибирають зі штамів роду *Corynebacterium*.

18. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що ферментаційний розчин збіднюють щонайменше одним продуктом метаболізму мікроорганізмів або щонайменше один продукт метаболізму мікроорганізмів виділяють із ферментаційного розчину, після чого видаляють леткі компоненти ферментаційного розчину, при цьому одержують тверду або напівтверду композицію, що містить білок.

19. Спосіб за одним із пунктів 1-17, який **відрізняється** тим, що леткі компоненти ферментаційного розчину без попереднього збіднення або виділення нелеткого продукту метаболізму мікроорганізмів та, в разі потреби, без попереднього виділення твердих компонентів, щонайменш частково виділяють, 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 цукорвмісного середовища, що включає щонайменше одну частину твердих компонентів крохмаловмісної 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 методи 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 розрізати 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 в усіх 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”, Jacques 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 com 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 потраплянні 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 принципівим 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.

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 принципові переваги при одержанні продуктів 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 ≤ 150 мкм. Тому в процесі здійснюваною з цією метою фільтрації частини використовуваного 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 амінокислоти.

Підвищені концентрації цукру у використовуваному 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. Подібний спосіб, що включає використання вибраної серед зерен зернових культур крохмаловмісної сировини, описаний у заявці PCT/EP2006/066057 (пріоритетна заявка на патент DE 10 2005042 541.0) даного заявника. Однак для безперервного одержання цукорвмісних середовищ з високою концентрацією цукру цей спосіб є досить затратним.

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 давати можливість здійснювати безперервний гідроліз крохмаловмісних компонентів сировини. Крім того спосіб повинен відрізнятися легкістю у застосуванні використовуваних засобів та їх безпроблемне використання у процесі ферментації. Зокрема спосіб повинен дозволити використання зернових культур як крохмаловмісної сировини.

Несподівано з'ясували, що ферментативний спосіб одержання органічних сполук, незважаючи на незмінно велику кількість введених твердих речовин, може бути здійснений ефективно у випадку використання необхідного для ферментації цукру у формі водного середовища, одержаного шляхом

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

ii) суспендування подрібненого матеріалу у водній рідині в такій кількості, при якій вміст сухої речовини у суспензії становить щонайменше 45 мас. %,

iii) гідролізу крохмаловмісного компоненту в подрібненому матеріалі шляхом розрідження та, в разі потреби, подальшого оцукрювання, при цьому одержують водне середовище М, що містить гідролізовані крохмаловмісні компоненти сировини та щонайменше частину твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль, причому гідроліз включає нагрівання суспензії подрібненого матеріалу шляхом введення водяної пари у суспензію до температури, вищої за температуру клейстеризації крохмалю, що входить до складу подрібненого матеріалу.

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 поряд зі стадіями i) та ii) включає також такі стадії:

iii) гідроліз крохмаловмісного компоненту в подрібненому матеріалі шляхом розрідження та, в разі потреби, подальшого оцукрювання, при чому одержують водне середовище М, що містить гідролізовані крохмаловмісні компоненти сировини та щонайменше частину твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль та

iv) застосування одержаного на стадії iii) водного середовища М в процесі ферментації для культивування мікроорганізму, здатного перевиробляти органічну сполуку,

причому на стадії iii) одержану на стадії ii) суспензію шляхом введення водяної пари у суспензію нагрівають до температури, вищої за температуру клейстеризації крохмалю, що входить до складу подрібненого матеріалу.

Незважаючи на високий вміст сухої речовини у використовуваний для гідролізу суспензії гідроліз може бути безпроблемно здійснений способом згідно з винаходом, в результаті чого одержують відповідно високі концентрації здатного до розщеплення цукру. При цьому неочікувано виявилось, що немає значення, в якій формі використовують цукор після гідролізу у формі моно- чи дисахаридів або у формі олігосахаридів (= декстринів). Крім того несподівано з'ясувалось, що високий вміст твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль, у одержаному середовищі не перешкоджає ферментації. До того ж за допомогою способу згідно з винаходом вдається уникати проблем із в'язкістю, які виникають при розрідженні крохмаловмісної сировини при високих концентраціях у подрібненому матеріалі. Завдяки високій концентрації здатних до розщеплення цукрів, пов'язаних із високим вмістом сухої речовини середовище може бути особливо вигідно використане на стадії підживлення процесу ферментації, що дозволяє уникнути або значно зменшити небажане розрідження. Крім того одержане згідно з винаходом середовище М може бути використане як джерело цукру в періодичній фазі ферментації.

Поняття "крохмаловмісна частина" та "крохмаловмісний компонент" тут та в усьому тексті є синонімічними.

Для одержаного на стадії iii) водного середовища М використовують синонімічні поняття "водне середовище", "рідке середовище" та "водна цукорвмісна рідина"

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 глюко-

зи 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 подрібнення 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 цукорвмісного рідкого середовища на стадії i) 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 i) 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 мале-

нький 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 показники 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'якоти.

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 крохмалю, відповідно до ступеню подрібнення. Щодо крохмаловмісних компонентів подрібненого матеріалу (та кількості розщеплюваного цукру в середовищі М), то вміст твердих компонентів, що не містять крохмалю, 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. %.

Після цього подрібнений матеріал на стадії ii) змішують з водною рідиною, наприклад, свіжою

водою, рециркульованою технологічною водою, наприклад, зі стадії ферментації, або із сумішшю цих рідин, при цьому одержують водну суспензію. Цей спосіб часто позначають також як процес одержання пульпи.

Як правило, з водним середовищем змішують таку кількість крохмаловмісної сировини або подрібненого матеріалу, що вміст сухої речовини у одержаній суспензії становить щонайменше 45 мас. %, переважно щонайменше 50 мас. %, зокрема щонайменше 55 мас. %, спеціально щонайменше 60 мас. %, наприклад, від 45 до 80 мас. %, переважно від 50 до 75 мас. %, зокрема від 55 до 70 мас. % та переважно від 60 до 70 мас. %.

Загалом можливо незначним чином підвищувати температуру водної рідини, використовуюваної для суспендування твердого подрібненого матеріалу, наприклад від 40 до 70 °C. Переважно температуру рідини слід вибирати таким чином, щоб температура одержаної суспензії була нижче температури клейстеризації, переважно щонайменше на 5 K нижче температури клейстеризації крохмалю. Переважно температура суспензії не перевищує 60 °C, зокрема 55 °C.

Суспендування гранульованого матеріалу у водній рідині можна здійснювати періодично або безперервно в звичайних установках, наприклад, періодично в апаратах з мішалками або у безперервно функціонуючих змішувальних установках для змішування твердих речовин з рідинами, наприклад, у змішувачах, що працюють за принципом ротор-статор.

Для здійснення гідролізу водну суспензію, що містить подрібнений матеріал, спочатку шляхом подачі водяної пари нагрівають до температури, вищою за температуру клейстеризації крохмалю, що входить до складу крохмаловмісної сировини або подрібненого матеріалу. При цьому необхідні для відповідного крохмалю температури відомі фахівцям (див цитований напочатку „The Alcohol Textbook-A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries”, розділ 2, стор 11) або можуть бути визначені у ході звичайних досліджень. Зазвичай суспензію нагрівають до температури, яка на щонайменше 10 K та зокрема на щонайменше 20 K, наприклад, на 10-100 K, зокрема на 20-80 K вище відповідної температури клейстеризації. Зокрема суспензію нагрівають до температури від 90 до 150 °C, особливо від 100 до 140 °C.

Під використовуюваної 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 перерахунок 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 змішувальному 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”, Kapitel 2, loc. cit. fig. 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 колонії. При цьому суспензію на виході із установки для обробки паром завантажують у верхній частині колонії та вивантажують у нижній частині. Відповідно до іншої форми виконання вивантаження 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.

Розрідження здійснюють звичайними способами. Як правило, розрідження на стадії ii) здійснюють в присутності щонайменше одного ферменту, що розріджує крохмаль, який, як правило, вибирають із групи α -амілаз. Крім того можуть бути використані і інші активні та стабільні в умовах реакції ферменти, що розріджують крохмаль.

Для розрідження крохмалю компоненту подрібненого матеріалу загалом можуть бути використані всі ферменти, що розріджують крохмаль, зокрема α -Amylase (клас ферментів EC 3.2.1.1), наприклад, α -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. Переважні ферменти є термостабільними, тобто навіть при їх нагріванні до температур, вищих за температуру клейстеризації, вони не втрачають свою ферментативну активність. Придатні для розрідження α -амілази наявні у продажу, наприклад, як продукти фірми Novozymes під назвою Termamyl 120L, тип L; або фірми Genencor під назвою Spezyme. Для розрідження може бути застосована також комбінація різних α -амілаз.

Вигідним чином кількості ферментів, що розріджують крохмаль, вибирають таким чином, щоб досягти швидкого та повного розщеплення крохмалю до олігосахаридів. Загальна кількість ферменту, що розріджує крохмаль, зокрема α -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 крохмалювмісної сировини α -амілаза (або відповідно використовуваний для розрідження крохмалю фермент) можна поміщати у реакційну посудину або додавати в ході стадії розрідження.

Для оптимальної дії α -амілази (або відповідно використовуваного для розрідження крохмалю ферменту) стадію ii) переважно принаймні час від часу здійснюють при значенні pH у оптимальному діапазоні для розріджувального ферменту, часто при значенні pH слабо кислого 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 ii); це

значення pH контролюють в ході процесу розрідження та, в разі потреби, регулюють. Встановлюють значення pH переважно за допомогою розріджених мінеральних кислот, таких як H_2SO_4 або H_3PO_4 , або за допомогою розріджених лугів, таких як NaOH або KOH.

Для стабілізації використовуваних ферментів, в разі потреби, концентрацію іонів Ca^{2+} , наприклад, за допомогою CaCl_2 , встановлюють на специфічному для ферментів оптимальному рівні. Придатні значення концентрації факівці визначають при проведенні звичайних досліджень. Якщо, наприклад, як α -амілазу використовують термаміл, то вигідними є концентрації 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 цієї метою у реакційну суміш можна додавати ще одну або кілька частин α -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 крохмалювмісної сировини.

Відповідно до переважної форми виконання вивантаження у суспензію подрібненого матеріалу у водній рідині перед її нагріванням водяною паром додають щонайменше частину або загальну кількість, як правило, щонайменше 50 %, зокрема щонайменше 80 % загальної кількості або всю загальну кількість ферменту, що розріджує крохмаль. Таким чином розрідження здійснюють вже в процесі нагрівання до температури, вищою за температуру клейстеризації. Нагрівання водяною паром та післяреакційну фазу здійснюють відповідним чином. При цьому подальше розрідження в окремій реакційній посудині можна пропускати. Однак з метою повного розщеплення крохмалю до декстринів таке розрідження все ж таки бажано здійснювати.

Таким чином одержують водний крохмалювмісний продукт гідролізу, який містить розріджений компонент крохмалю подрібненого матеріалу, зазвичай декстрини та, в разі потреби, інші олігосахариди та моно- або дисахариди, а також компоненти подрібненого матеріалу, що не містять крохмаль, зокрема тверді компоненти використовуваного для розрідження подрібненого матеріалу, що не містять крохмаль.

Цей продукт гідролізу як водне середовище M можна безпосередньо піддавати ферментації органічної сполуки. Однак часто його піддають також оцукрюванню. Оцукрювання можна здійснювати аналогічно відомим способам оцукрювання рівня техніки.

Оцукрювання можна здійснювати періодично або безперервно. З цієї метою розріджене середовище зазвичай повністю оцукрюють у спеціальному резервуарі для оцукрювання перед його ви-

користанням, наприклад, на іншій стадії ферментації. При цьому одержаний після розрідження водний продукт обробляють ферментом, який сприяє оцукрюванню, зазвичай глюकोамілазою, в звичайних для цього умовах.

Для оцукрювання декстринів (тобто олігосахаридів) загалом можуть бути використані всі глюкоамілази (клас ферментів EC 3.2.1.3), зокрема глюкоамілази, одержані із *Aspergillus*, а саме такі, які використовують для оцукрювання одержаних способом сушого подрібнення матеріалів у рамках одержання біоетанолу. Придатні для оцукрювання глюкоамілази також наявні у продажу, наприклад, як продукти фірми Novozymes під назвою Dextrozyme GA; або фірми Genencor під назвою Optidex. Крім того може бути використана комбінація різних глюкоамілаз.

Оцукрювальний фермент зазвичай додають у одержаний в результаті розрідження продукт гідролізу, що містить декстрини, у кількості від 0,001 до 5,0 мас. %, переважно від 0,005 до 3,0 мас. % та особливо переважно від 0,01 до 1,0 мас. %, у перерахунку на загальну кількість використовуваної крохмаловмісної сировини.

Як правило, оцукрювання здійснюють в оптимальному для оцукрювального ферменту температурному діапазоні або при трохи нижчих температурах, наприклад, від 50 до 70 °C, переважно від 60 до 65 °C. Переважно спочатку у водному розрідженому продукті встановлюють відповідні температури, а потім додають фермент, який ініціює оцукрювання. Особливо переважно перед додаванням оцукрювального ферменту, наприклад, глюкоамілази, у водному продукті гідролізу встановлюють відповідне значення pH, оптимальне для використовуваного ферменту, наприклад, від 3,5 до 6,0, переважно від 4,0 до 5,5 та найбільш переважно від 4,0 до 5,0.

Після додавання оцукрювального ферменту суспензію, що містить декстрини, тримають при встановленій температурі переважно протягом часу від 2 до 72 годин або навіть довше, якщо це необхідно, зокрема від 5 до 48 годин, при цьому декстрини оцукрюються до моносахаридів. Хід процесу оцукрювання можна контролювати відомими фахівцям методами, наприклад, ВЕРХ, ферментативним тестом або за допомогою паличок для виявлення глюкози. Оцукрювання вважається завершеним, коли концентрація моносахаридів більше не підвищується або знову падає.

Оскільки для одержання водного продукту гідролізу використовують подрібнений матеріал, який в основному містить 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 одержаний в результаті розрідження та, в разі потреби, подальшого оцукрювання водний продукт гідролізу 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 в продукт гідролізу вигідно додавати одну або кілька фітаз 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 (Т50) 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.

Для підвищення загального виходу цукру або з метою одержання вільних амінокислот в процесі розрідження або в процесі оцукрювання можна додавати інші ферменти, наприклад, пулюлази, целюлози, геміцелюлази, глюканази, ксиланази, глюкозидази 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.

Відповідно до іншої форми виконання винаходу перед початком ферментації не здійснюють ніякого або здійснюють лише часткове оцукрювання. В даному випадку оцукрювання принаймні частково здійснюють в ході ферментації, тобто *in-situ*. При цьому в процесі ферментації оцукрюють, наприклад, частину одержаних в ході ферментації декстринів, наприклад, від 10 до 90 мас. % та зокрема від 20 до 80 мас. %, у перерахунку на загальну кількість декстринів (або відповідно первинного крохмалю), після чого одержане цукровмісне середовище використовують у ферментації. В даному випадку у ферментаційному середовищі подальше оцукрювання можна здійснювати *in situ*. Крім того оцукрювання можна здійснювати без використання окремого резервуару безпосередньо у ферментері.

Оцукрювання *in situ* можна здійснювати при додаванні оцукрювальних ферментів, як описано вище, або за відсутності таких ферментів, оскільки багато мікроорганізмів самі здатні розщепляти олігосахариди. При цьому декстрини як такі використовують після вироблення мікроорганізмом та розщепляють або гідролізують після попереднього оцукрювання штам-характерними оцукрювальними ферментами, наприклад, штам-характерними глюкоамілазами, та після цього розщепляють. Особливо вигідно в останньому випадку в ході ферментації автоматично пристосовувати швидкість оцукрювання, зокрема швидкість вивільнення глюкози, з одного боку за допомогою кількості біомаси, а з іншого боку за допомогою рівня експресії штам-характерних оцукрювальних ферментів до потреб мікроорганізмів.

Перевагою оцукрювання *in-situ* з одного боку є зменшення інвестиційних витрат, а з іншого боку за допомогою уповільненого вивільнення глюкози, в разі потреби, можна використовувати вищу концентрацію глюкози у вихідній суміші, при цьому інгібування або зміни в процесі метаболізму використовуваних мікроорганізмів не спостерігаються. У випадку *E. coli* надто висока концентрація глюкози приводить, 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). Уповільнене вивільнення глюкози досягається регулюванням концентрації глюкоамілази. Таким чином вдається придушити зазначені вище ефекти, при цьому можна брати більшу кількість субстрату, що дозволяє зменшувати розрідження підведеного живильного потоку.

Вміст сухої речовини у водному продукті гідролізу, одержаному в результаті розрідження та, в разі потреби, здійснюваного оцукрювання, тобто у середовищі М, становить зазвичай щонайменше 45 мас. %, переважно щонайменше 50 мас. %, зокрема щонайменше 55 мас. %, особливо переважно щонайменше 60 мас. %, наприклад, від 45 до 80 мас. %, переважно від 50 до 75 мас. %, зокрема від 55 до 70 мас. % та особливо переважно від 60 до 70 мас. %. Таким чином концентрація цукру в одержаному в результаті гідролізу водному середовищі М, позначеному як еквівалент глюкози, як правило, становить щонайменше 35 мас. %, частіше щонайменше 40 мас. %, зокрема щонайменше 45 мас. %, особливо переважно щонайменше 50 мас. %, наприклад, від 35 до 70 мас. %, переважно від 40 до 65 мас. %, зокрема від 45 до 60 мас. % та особливо переважно від 50 до 60 мас. %, у перерахунку на загальну вагу середовища М.

Еквіваленти глюкози, що входять до складу одержаного середовища М, залежно від методики здійснення способу існують у формі моно- або олігосахаридів, зокрема декстринів. Основним компонентом є зазвичай моносахариди, такі як гексози та пентози, наприклад, глюкоза, фруктоза, маноза, галактоза, сорбоза, ксилоза, арабіноза та рибоза, зокрема глюкоза або олігосахариди цих моносахаридів. Вміст відмінних від глюкози моносахаридів у вільній формі або як компонентів олігосахаридів у середовищі М можна варіювати залежно від використовуваної крохмаловмісної сировини та компонентів, що входять до її складу та не містять крохмаль, та впливати різними способами, наприклад, розщепленням компонентів целюлози шляхом додавання целюлаз. Зазвичай вміст глюкози, у вільній та зв'язаній формі, в суміші еквівалентів глюкози середовища М становить від 50 до 99 мас. %, зокрема від 75 до 97 мас. % та переважно від 80 до 95 мас. % у перерахунку на загальну кількість еквівалентів глюкози.

Одержане на стадії iii) водне середовище М згідно з винаходом використовують на стадії iv) для ферментативного одержання бажаної органічної сполуки. З цієї метою середовище М піддають

ферментації, в якій це середовище служить для культивування використовуваних у ферментації мікроорганізмів. При цьому одержують відповідну органічну сполуку як леткий або нелеткий продукт метаболізму мікроорганізмів.

Як правило, декстринвмісне середовище М до його використання в процесі ферментації охолоджують до температури ферментації, зазвичай в діапазоні від 32 до 37 °C.

Водне декстринвмісне середовище М перед ферментацією, в разі потреби, можна стерилізувати, причому мікроорганізми вбивають, як правило, термічними або хімічними способами. З цієї метою водне середовище М зазвичай нагрівають до температури вище 80 °C. Знищення або відповідно лізин клітин можна здійснювати безпосередньо перед ферментацією. З цієї метою все середовище М піддають лізису або знищенню. Це можна здійснювати, наприклад, термічним або хімічним способом. Однак в рамках способу згідно з винаходом виявилось, що немає необхідності перед ферментацією здійснювати стадію стерилізації, як описано вище, більш того набагато вигіднішим виявився спосіб, згідно з яким стадію стерилізації не здійснюють. Таким чином переважна форма виконання винаходу стосується способу, згідно з яким одержане на стадії iii) середовище М безпосередньо, тобто без попередньої стерилізації, піддають ферментації.

Під час ферментації відбувається розщеплення цукру, що входить до складу середовища. Якщо цукор міститься у середовищі у формі олігосахаридів, зокрема у формі декстринів, то ці речовини використовують як такі у вигляді продуктів метаболізму мікроорганізмів або після попереднього оцукрювання доданими або штам-характерними здатними до оцукрювання ферментами, зокрема глюкоамілазами, та розщеплюють. Якщо оцукрювальні ферменти не додають та цукор, що входить до складу середовища, використовують у формі олігосахаридів, зокрема декстринів, то оцукрювання розріджених компонентів крохмалю здійснюють паралельно розщепленню цукру, зокрема моносахариду, мікроорганізмами.

Ферментацію можна здійснювати відомими фахівцям звичайними способами. Для цього бажаний мікроорганізм, як правило, культивують у рідкому середовищі, одержаному описаним тут способом.

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

Так, наприклад, одержане способом згідно з винаходом середовище М або звичайне джерело цукру, тобто здатні до розщеплення моно-, ди- та/або олігосахариди або середовища, 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 екстрак-

ти, 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 цукор, що міститься у ферментаційному середовищі, розщеплюють, в результаті чого утворюється бажаний продукт метаболізму (так званий періодичний метод або періодична фаза).

При здійсненні безперервного способу по закінченню періодичної фази, наприклад, коли загальна концентрація цукру впаде нижче певного значення, середовище М безперервно або періодично подають у ферментаційне середовище.

Типовим є варіант безперервного виконання способу згідно з винаходом, що включає такі стадії

v) культивування здатного до перевиробництва органічної сполуки мікроорганізму у водному ферментаційному середовищі F та

vi) додавання середовища М у ферментаційне середовище F, в якому гідролізовані компоненти крохмалю, що входять до складу середовища М, тобто цукор, розщеплюються здатними переворітляти органічну сполуку мікроорганізмами з утворенням органічної сполуки.

Так, наприклад, на стадії v) спочатку у звичайному цукорвмісному середовищі, як правило, у розчині глюкози, 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 F становить менше 6 мас. %, наприклад, від >0 до 5 мас. %, визначених як еквіваленти глюкози, у перерахунку на загальну вагу ферментаційного середовища F. Приготоване таким чином цукорвмісне реакційне середовище інокулюють бажаним мікроорганізмом, після чого мікроорганізм розмножують у реакційному середовищі (ферментаційному середовищі F) в умовах ферментації, доки концентрація мікроорганізмів не досягне бажаного для ферментації постійного значення. При цьому цукор, що міститься у ферментаційному середовищі F, розщеплюють, в результаті чого утворюється бажаний продукт метаболізму.

Шляхом додавання водного середовища М у ферментаційне середовище F відповідно до стадії vi) підтримують процес ферментації, а перевироблений мікроорганізмом продукт метаболізму насичується у ферментаційному розчині. При цьому об'ємне співвідношення доданого середовища М та використовуваного реакційного середовища, що містить мікроорганізми, (ферментаційне середовище F) загалом становить від приблизно 1:10 до 10:1 та переважно від приблизно 1:5 до 5:1, зокрема від 1:1 до 5:1. Переважно за допомогою швидкості подачі цукорвмісного рідкого середови-

ща можна регулювати вміст цукру у ферментаційному розчині. Як правило, швидкість подачі встановлюють такою, щоб вміст моносахаридів у ферментаційному розчині знаходився у діапазоні від >0 мас. % до приблизно 5 мас. %, зокрема не перевищував 3 мас. %.

Відповідно до переважної форми виконання винаходу ферментаційне середовище F на стадії v) (тобто в даному випадку реакційне середовище) включає в основному середовище М, здатні до перевироблення органічної сполуки мікроорганізми, живильні солі, звичайні допоміжні речовини, такі як основи або буферні розчини, та, в разі потреби воду для розрідження. При цьому середовище М, в разі потреби, розріджують до бажаної концентрації цукрів, наприклад, від 0,1 до 10 мас. %, визначених як еквіваленти глюкози у перерахунку на загальну вагу середовища М, після чого його використовують безпосередньо для приготування ферментаційного середовища F (реакційне середовище).

Вміст цукру у використовуваному для підтримання ферментації декстринвмісному середовищі на стадії vi) зазвичай знаходиться вище, наприклад, лежить у зазначених вище діапазонах, з метою мінімізації розрідження ферментаційного середовища F.

Переважно діють таким чином: одержують водне середовище М з більш високою концентрацією цукрів, наприклад, щонайменше 40 мас. %, переважно щонайменше 45 мас. % та особливо переважно щонайменше 50 мас. %, визначених як еквіваленти глюкози, у перерахунку на водне середовище М. Це середовище М з одного боку використовують на стадії v) після розрідження водою для приготування реакційного середовища (ферментаційного середовища F) та з іншого боку на стадії vi) для завантаження у ферментаційне середовище F.

Згідно з винаходом у періодичній та/або у безперервній фазі основна кількість, переважно щонайменше 60 мас. %, зокрема щонайменше 70 мас. % використовуваного у ферментації розщеплюваного цукру походить із середовища М. В одній із форм виконання винаходу частина, наприклад, від 1 до 50 мас. %, зокрема від 5 до 40 мас. % та переважно від 10 до 30 мас. % використовуваного у ферментації розщеплюваного цукру походить зі звичайних джерел цукру. До звичайних джерел цукру належать моно- та дисахариди, такі як глюкоза та сахароза, а також середовища, які містять здатні до розщеплення моно-, ди-та/або олігосахариди у концентрації щонайменше 50 мас. % та в основному не містять нерозчинні у воді тверді речовини, наприклад, сиропи глюкози, сиропи сахарози, згущені соки, сиропи мальтози, декстринові сиропи, а також побічні продукти із процесу одержання цукру (меласи), зокрема меласи із процесу одержання бурякового цукру та меласи із процесу одержання тростинного цукру.

Способом згідно з винаходом 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 °С та зокрема вище 200 °С. 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 М 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 три карбонові 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, нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД) та аденозин-5'-монофосфат (АМФ); ліпіди, насичені та ненасичені жирні кислоти, що містять переважно від 10 до 22 атомів вуглецю, наприклад, γ -ліноленова, дигомо- γ -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, палуронова кислота та трегалоза; ароматичні сполуки, наприклад, ароматичні аміни, ванілін та індіго; вітаміни та провітаміни, наприклад, аскорбінова кислота, вітамін В₆, вітамін В₁₂ та рибофлавін, кофактори та так звані нутріцевтичні 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, глюканази, фітази; кароти-

ноїди, наприклад, лікопін, β -каротин, астаксантин, 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, γ -бутиролактон, циклодекстрини, біополі мери, 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 нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ), вихідною сполукою цих кофакторів є ніацин.

Поняття "нутріцевтичний 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 енантіомерній формі (якщо у даному випадку можливі різні енантіомери) Так, наприклад, із амінокислот, як правило, одержують відповідний L-енантіомер.

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, Weinheim, VCH, 1980</i> та 1993-1995, Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)</i> |
| Ітаконова кислота | <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus itaconicus</i> | Jakubowska, Smith u Pateman (видавн), <i>Genetics and Physiology of Aspergillus, London Academic Press 1977</i> , Miall, in Rose (видавн), <i>Economic Microbiology, том 2, стор 47-119, London Academic Press 1978, US 3044941 (1962)</i> |
| Бурштинова кислота | <i>Actinobacillus sp 130Z</i> , <i>Anaerobiospirillum succiniproducens</i> , <i>Actinobacillus succinogenes</i> , <i>E coli</i> | <i>Int J Syst Bacteriol 26, 498 -504 (1976)</i> , EP 249773 (1987), Erf Lemme u Datta, US 5504004 (1996), Erf Guettler, Jain u Soni, <i>Arch Microbiol 167, 332 -342 (1997)</i> , Guettler MV, Rumler D, Jain MK, <i>Actinobacillus succinogenes sp nov</i> , a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen <i>Int J Syst Bacteriol 1999 Jan, 49 Pt 1 207-16</i> , 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 delbrueckii</i> , <i>L leichmannii</i> або <i>Sporolactobacillus inulinus</i> | ROMPP Online Version 2 2 |
| Пропіонова кислота | <i>Propionibacterium</i> , напр <i>P arabinosum</i> , <i>P schermanii</i> , <i>P freudenreichii</i> , <i>Clostridium</i> | Rehm, H-J <i>Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980</i> та 1993-1995, Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)</i> , |

| | | |
|---------------------------|---|--|
| Діамінопімелінова кислота | <i>Corynebacterium glutamicum</i> | Rehm, H-J <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995, Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973), |
| Лимонна кислота | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus wentii</i> | <i>Crit Rev Biotechnol</i> 3, 331 -373 (1986), <i>Food Bio-technol</i> 7, 221-234 (1993), 10, 13-27 (1996) |
| Аконітова кислота | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus wentii</i> | <i>Crit Rev Biotechnol</i> 3, 331 -373 (1986), <i>Food Biotechnol</i> 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> , напр <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A niger</i> , <i>A oryzae</i> , <i>Corynebacterium</i> | US 3,063,910 |
| Глюконова кислота | <i>Aspergilli</i> , напр <i>A niger</i> | Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , 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 delbruckii</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), <i>Adv Biochem Engin/Biotechnol</i> 79, 1-35 |
| Глютамат | <i>Corynebacterium glu-tamicum</i> | Ikeda, M <i>Amino Acid Production Process</i> (2003), <i>Adv Biochem Engin/Biotechnol</i> 79, 1-35 |
| Метионін | <i>Corynebacterium glu-tamicum</i> | Ikeda, M <i>Amino Acid Production Process</i> (2003), <i>Adv Biochem Engin/Biotechnol</i> 79, 1-35 |
| Фенілаланін | <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>E coli</i> | <i>Trends Biotechnol</i> 3, 64 -68 (1985), <i>J Ferment Bioeng</i> 70, 253-260 (1990) |
| Треонін | <i>E coli</i> | Ikeda, M <i>Amino Acid Production Process</i> (2003), <i>Adv Biochem Engin/Biotechnol</i> 79, 1-35 |
| Аспарагінова кислота | <i>E coli</i> | Ikeda, M <i>Amino Acid Production Process</i> (2003), <i>Adv Biochem Engin/Biotechnol</i> 79, 1-35 + цитовані там літ джер, Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973) |

| | | |
|---|---|--|
| Пуринова та піримідинова основи | <i>Bacillus subtilis</i> | Rehm, H-J <i>Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980</i> ma 1993-1995, Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)</i> |
| Нікотинамідаденін- динуклеотид (НАД) | <i>Bacillus subtilis</i> | Rehm, H-J <i>Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980</i> ma 1993-1995, Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)</i> |
| Аденозин-5'- монофосфат (АМФ) | <i>Bacillus subtilis</i> | Rehm, H-J <i>Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980</i> ma 1993-1995, Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)</i> |
| γ-ліноленова кислота | <i>Mucor, Mortiella, Aspergillus spp</i> | Gill, I, Rao, V <i>Polyunsaturated fatty acids, part 1 occurence, biological activities and applications (1997) Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409, Zhu, H Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production Master Thesis Lousiana State University, 31 10 2002 (URN etd-1111102-205855)</i> |
| Дигомо-γ- ліноленова кислота | <i>Mortiella, Conidiobolus, Saprolegnia spp</i> | Gill, I, Rao, V <i>Polyunsaturated fatty acids part 1 occurence, biological activities and applications (1997) Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409, Zhu, H Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production Master Thesis Lousiana State University, 31 10 2002 (URN etd-1111102-205855)</i> |
| Арахідонова кислота | <i>Mortiella, Phytium spp</i> | Gill, I, Rao, V <i>Polyunsaturated fatty acids, part 1 occurence, biological activities and applications (1997) Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409, Zhu, H Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production Master Thesis Lousiana State University, 31 10 2002 (URN etd-1111102-205855)</i> |
| Ейкозапентаєнова кислота | <i>Mortiella, Phytium spp, Rhodopseudomonas, Shewanella spp</i> | Gill, I, Rao, V <i>Polyunsaturated fatty acids part 1 occurence, biological activities and applications (1997) Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409, Zhu, H Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production Master Thesis Lousiana State University, 31 10 2002 (URN etd-1111102-205855)</i> |

| | | |
|--------------------------|--|--|
| Докозагексаєнова кислота | <i>Thraustochytrium</i> , <i>Entomophthora</i> spp, <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> spp | Gill, I, Rao, V <i>Polyunsaturated fatty acids, part 1 occurrence, biological activities and applications</i> (1997) <i>Trends in Biotechnology</i> 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-1111102-205855) |
| 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 ma 1993-1995, Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , 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 ma 1993-1995, Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973) |
| Гліцерин | Дріжджі, <i>Saccharomyces rouxii</i> | Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973) |
| Маніт | <i>Aspergillus candida</i> , <i>Torulopsis mannifaciens</i> | Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973) |
| Арабіт | <i>Saccharomyces rouxii</i> , <i>S mellis</i> , <i>Sclerotium glaucanicum</i> , <i>Pichia ohmen</i> | Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973) |
| Ксиліт | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973) |
| Гіалуронова кислота | <i>Streptococcus</i> sp | Rehm, H -J <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 ma 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 Basidiomycotinous Yeast, Filobasidium floriforme</i> <i>Journal of Fermentation and Bioengineering</i> 81, (1996) 4, 315-319 |
| Аскорбінова кислота | <i>Gluconobacter melanogenes</i> | ROMPP Online Version 2 2 |
| Вітамін В ₁₂ | <i>Propionibacterium</i> spp, <i>Pseudomonas denitrificans</i> | Chem Ber 1994, 923 -927, ROMPP 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 New biotechnology for riboflavin (vitamin B ₂) and character of this riboflavin <i>Fragrance Journal</i> (2003), 31(3), 44-48 |
| Вітамін В ₆ | <i>Rhizobium tropici</i> , <i>R. meliloti</i> | EP0765939 |
| Фермент | Apergilli (напр <i>Aspergillus niger</i> <i>A. oryzae</i>), <i>Trichoderma</i> , <i>E. coli</i> , <i>Hansenula</i> або <i>Pichia</i> (напр <i>Pichia</i> <i>pastorius</i>), <i>Bacillus</i> (напр <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>) і ін | Rehm, H -J <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 ma 1993-1995, Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973), |
| Зеаксантин | <i>Dunaliella salina</i> | Jin et al (2003) <i>Biotech Bioeng</i> 81 115-124 |
| Кантаксантин | <i>Brevibacterium</i> | Nelis 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 |
| β-каротин | <i>Blakeslea trispora</i> , <i>Candida utilis</i> | Kim S , Seo W , Park Y , Enhanced production of beta-carotene from <i>Blakeslea</i> <i>trispora</i> with Span 20, <i>Bio-technology</i> <i>Letters</i> , Vol 19, No 6, 1997, 561-562, Man- touridou F , Roukas T Effect of the aeration rate and agitation speed on beta-carotene production and mor-phology of <i>Blakeslea</i> <i>trispora</i> in a stirred tank reactor mathematical modelling, <i>Biochemical</i> <i>Engineering Journal</i> 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 |
| Полігідроксиалка- ноати поліестери | <i>Escherchia coli</i> , <i>Alcaligenes latus</i> і ін | S Y Lee, <i>Plastic Bacteria Progress and</i> <i>Prospects for polyhydroxyalkanoate</i> <i>production in bacteria</i> , <i>Tibtech</i> , Vo 14, (1996), S 431-438 , Steinbuchel, 2003, Steinbuchel (Hg), <i>Biopolymers</i> , 1 вид , 2003, Wiley-VCH, Weinheim та цитовані там літературні джерела |

| | | |
|----------------------|---|---|
| Полісахариди | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L. dextranicum</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> і ін | <i>Rehm, H-J Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 ma 1993-1995, Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)</i> |
| Поліізопреноїди | <i>Lactarius sp</i> , <i>Hygrophorus sp</i> , <i>Russula sp</i> | <i>Steinbuchel (Hg), Biopolymers, 1 вид, 2003, Wiley-VCH Weinheim та цитовані там літературні джерела</i> |
| Ацетон | <i>Clostridium</i> (напр <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. propionicum</i>) | <i>Rehm, H-J Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 ma 1993-1995, Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)</i> |
| Ацетоін | <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Lengeier, J W, Drews, G, Schlegel, H G Hrsg, Biology of the Prokaryotes, Thieme, Stuttgart (1999), S 307, ROMPP Online-Edition</i> |
| Ванілін | <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Amycolatopsis sp</i> | <i>Priefert, H, Rabenhorst, J, Seinbuchel, A Biotechnological production of vanillin Appl Microbiol Biotechnol 56, 296-314 (2001)</i> |
| Турингенсин | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Jian-Zhong Jong et al Fed-batch culture of Bacillus thuringiensis for thuringensin production in a tower type bioreactor Biotechnology and Bioengineering 48 (3) (2004), 207-213</i> |
| Полікетиди | <i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Sorangium cellulosum</i> | <i>Kirst Fermentation-derived compounds as a source for new products Pure & Appl Chem 70 (2), (1998), 335-338, Zirkle et al Heterologous production of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A of Sorangium cellulosum So ce26 in Streptomyces lividans Microbiology 150 (8), (2004), 2761-74</i> |
| Гіберелінова кислота | <i>Gibberella fujikuroi</i> | <i>Hollmann et al Extraktiv-Fermentation von Gibberellinsäure mit Gibberella fujikuroi CIT 7 (1995), 892-895</i> |
| Індіго | <i>Escherichia coli</i> JB 102 | <i>Berry, A, Dodge, T C, Pepsin, M, Weyler, W Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 28 (2002), 127-133</i> |

Відповідно до переважних форм виконання винаходу одержана органічна сполука вибрана із моно-, ди- та трикарбонових кислот, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю та, в разі потреби, містять гідроксильні групи, протеїногенних та непротеїногенних 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, нутрі-

цевтичних засобів, протеїнів, 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, ксиланази або глюканази.

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 та глутамат.

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.

Ще одна переважна форма виконання винаходу стосується застосування одержаного згідно з винаходом рідкого середовища для ферментативного одержання таких сполук

- моно-, ди- та три карбонових кислот, зокрема аліфатичних моно- та дикарбонових кислот, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, таких як пропіонова, фумарола та бурштинова кислота,

- аліфатичних гідроксикарбонових кислот, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, таких як молочна 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 продуктом метаболізму мікроорганізмів розуміють полігідроксиалканоати, такі як полі-3-гідроксибутират, та співполіестери інших органічних гідроксикарбонових кислот, таких як 3-гідроксивалеріанова кислота, 4-гідроксимасляна кислота та інші, описані у працях під редакцією Steinbüchel, наприклад, довго ланцюгові гідроксикарбонові 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, ксиланаза або глюканаза;

- амінокислоти, такі як лізин треонін або метіонін;

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

- дисахариди, такі як трегалоза;

- аліфатичні моно- та дикарбонові кислоти, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, такі як пропіонова, фумарола та бурштинова кислота;

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

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

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

- алканоли, що містять від 4 до 10 атомів вуглецю, такі як бутанол, та алкандіолі, що містять від 3 до 8 атомів вуглецю, такі як пропандіол.

Придатні мікроорганізми зазвичай вибирають з родів *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ashbya*, *Eschenchia*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Rhizopus* та *Clostridium*, зокрема штамів *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* oder *Alcaligenes latus*, *Anaerobiospirillum succiniproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus leichmannii*, *Propionibacterium arabinosum*, *Propionibacterium schermanimi*, *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*. Переважно 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 використовуваним у ферментації мікроорганізмом розуміють штам з роду *Eschenchia*, зокрема штам *Eschenchia coli*. Переважно мова йде про штам з роду *Eschenchia*, зокрема *Eschenchia 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 вугле-

цю, наприклад, в WO 01/011052, DE 19840709, WO98/29539, EP 1186664 та Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this ri-boflavin. *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. 1207-16; US 5,723,322, US 5,573,931, US 5,521,075, WO 99/06532, US 5,869,301 oder 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 крохмалю, наприклад, волокна та невикористаний цукор, а також невикористані буферні та живильні солі. Це рідке середовище в даній заявці позначають як ферментаційний розчин, причому ферментаційний розчин включає також додане декстринвмісне середовище (1), 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 (I) виконання винаходу стосується способу, згідно з яким щонайменше один продукт метаболізму мікроорганізмів збіднюють та виділяють із ферментаційного розчину. Після цього видаляють леткі компоненти фермен-

таційного 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, тобто органічної сполуки, що містить щонайменше 3 атоми вуглецю або щонайменше 2 атоми вуглецю та 1 атом азоту (яку надалі називають цільовим продуктом), 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 продукту метаболізму із ферментаційного розчину можна здійснювати в одну або кілька стадій. Важливою стадією при цьому є виділення твердих компонентів із ферментаційного 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 та рідкій фазі, фахівцями 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), und 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, при застосуванні хроматографічних або екстракційних способів. Як хроматографічний спосіб зокрема слід назвати спосіб йонообмінної 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.

ка. Прикладами сполук, що можуть бути одержані таким чином, є γ -ліноленова кислота, дигомо- γ -ліноленова кислота, арахідонова, ейкозапентаєнова та докозагексаєнова кислоти, 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 (II) виконання винаходу стосується способу, згідно з яким леткі компоненти ферментаційного розчину 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 РСТ/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 (II) виконання 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 крохмаль, 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 крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль, або щонайменше їх великі частини, часто у кількості щонайменше 90 мас. % або у загальній кількості твердих компонентів, що не містять крохмаль.

Шляхом додавання допоміжних речовин для одержання композиції, таких як носи 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

но 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, адсорбенти, 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 сублімаційної 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 властивостей 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 1038527, ЕР 0648076, ЕР 835613, ЕР 0219276, ЕР 0394022, ЕР 0547422, ЕР 1088486, WO98/55599, ЕР 0758018 та WO 92/12645.

В першому варіанті цієї форми (II) виконання 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 (II) 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 ексцентриккові шнекові насоси (наприклад,

фірми Delasco PCM) або насоси високого тиску (наприклад, фірми LEWA Herbert Ott GmbH).

Здійснення ферментації при застосуванні цукровмісного рідкого середовища згідно з винаходом може відбуватися також таким чином

vii) із одержаного на стадії iii) середовища М, що включає тверді компоненти крохмаловмісної сировини, які не містять крохмаль, виділяють частину продукту, не більше 50 мас. %, наприклад, від 5 до 45 мас. %, у перерахунку на загальну вагу, а залишкову кількість піддають ферментації для одержання першого продукту (А) метаболізму, наприклад, нелеткого продукту (А) метаболізму у твердій формі або леткого продукту (А) метаболізму, та

viii) 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 (В) метаболізму, що ідентичний продукту (А) метаболізму або відрізняється від нього.

У випадку виділення твердих компонентів, що не містять крохмаль, відповідно до стадії vii) вміст твердої речовини у залишковій кількості середовища М 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 (В) метаболізму.

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

Переважна форма виконання цього способу стосується паралельного одержання ідентичних продуктів (А) та (В) 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 (А) метаболізму, наприклад, використовувану як добавка до кормів амінокислоту, наприклад, лізин, метіонін, треонін або глутамат, одержують при застосуванні ферментаційного розчину, що містить тверду речовину, а ідентичний другий продукт (В) метаболізму, наприклад, ту ж саму використовувану як харчова добавка амінокислоту, одержують при застосуванні ферментаційного розчину, збідненого твердими речовинами на стадії viii). 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 А метаболізму, наприклад, амінокислот, таких як лізин, метіонін, глутамат або треонін лимонної кислоти або етанолу, наприклад, згідно з описаними в WO 2005/116228 (РСТ/EP2005/005728) або РСТ/EP2006/066057 (пріоритетна заявка DE 10 2005 042 541.0) способами або відповідно до способів, описаних для ферментативного одержання біоетанолу. Відповідно до стадії vii) виділяють частину одержаного на стадії iii) середовища М. Виділену відповідно до стадії vii) частину на стадії viii) можна повністю або частково очищувати від твердих речовин звичайними способами, наприклад, центрифугуванням або фільтруванням, залежно від вимог ферментації для одержання продукту В. Одержане таким чином, в разі потреби, повністю або частково звільнене від твердих речовин середовище М відповідно до стадії viii) піддають ферментації для одержання продукту В метаболізму. Виділений на стадії viii) потік твердих речовин переважно повторно використовують у потоці середовища М при здійсненні ферментації у великих масштабах.

Якщо одержаним в ході ферментації у великих масштабах продуктом (А) метаболізму мікроорганізмів є етанол, то одержане на стадії iii) середовище М містить такі концентрації моно-, ди- або олігосахаридів, які зазвичай використовують при ферментативному одержанні етанолу (біоетанолу), наприклад, від 25 до 33 мас. %. Здійснення методу виділення твердих речовин відповідно до стадії viii) 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, метіонін, глутамат, або лимонної кислоти чи етанолу, як описано вище. Відповідно до стадії vii) частину одержаного на стадії iii) середовища М вивантажують та відповідно до стадії viii) 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 М на стадії viii) піддають ферментації з метою одержання продукту В метаболізму, в даному випадку рибофлавіну. Виділений відповідно до стадії viii) потік твердої речовини переважно повторно використовують у потоці середовища М при здійсненні ферментації у великих масштабах.

Одержаний таким чином на стадії viii) 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 десантуванням. 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 viii) 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 містять 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 продукт 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 М, попередньо очищене, переважно в основному звільнене від твердих речовин відповідно до стадії vii), піддають ферментації відповідно до стадії viii) 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 viii) 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 розпилювальної сушці.

Виділені тверді речовини можуть бути одержані в рамках паралельно здійснюваного у великих масштабах способу ферментації разом із від-

повідним 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 I 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 I

| 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) Розрідження у нагрівачі з прямим нагрівом

Для безперервного розрідження сухої подрібненої кукурудзяної муки встановлюють два резервуари з мішалками об'ємом 250 л, з яких поперемінно з годинним інтервалом розчинену у воді кукурудзяну муку подають у нагрівач з прямим нагрівом. Типову для цього резервуару суміш одержують шляхом введення 117 кг води, в яку додають α -амілазу, наприклад, термамил SC, у концентрації 0,10 мас. % (у перерахунку на використовувану кількість муки). Потім при температурі приблизно 45 °C кількома стадіями додають 133 кг кукурудзяної муки та перемішують. Після встановлення Ca^{2+} -концентрації 50 м.ч., наприклад, шляхом додавання CaCl_2 , значення рН становить від 5,6 до 5,8. Після додавання всіх компонентів суспензію кукурудзяної муки інтенсивно перемішують перед завантаженням у нагрівач з прямим нагрівом. Потім цю суспензію поміщають у нагрівач з прямим нагрівом зі швидкістю 250 кг/год. при тиску 5 бар. Суспензію кукурудзяної муки нагрівають від температури клейстеризації до 105 °C паралельною подачею 25 кг/год. пари (7,5 бар). У під'єднаному до нагрівача з прямим нагрівом труб-

частому реакторі при часі витримки 5 хв частину попередньо клестеризованого крохмалю розщеплюють до одержання декстринів (перше розрідження). Потім температуру реакційної суміші миттєво знижують до 90 °С, при цьому відходить приблизно 5 кг/год. Пару. Після цього при 90 °С в іншому трубчастому реакторі протягом 100 хвилин здійснюють друге розрідження до повного розщеплення крохмалю до декстринів. Одержану реакційну суміш при втраті води приблизно 14 кг/год. знову миттєво охолоджують до температури оцукрювання, що становить 61 °С..

II 1) Оцукрювання

Частину одержаної у пункті II.1) реакційної суміші оцукрюють. З цією метою у резервуар з мішалкою поміщають приблизно 1000 г реакційної суміші та постійно перемішують при температурі 61 °С. Перемішування здійснюють протягом усього дослідження. Після встановлення значення рН = 4,3 за допомогою H₂SO₄ додають 17,9 г (15,2 мл). Декстрозим GA (фірми Novozymes A/S). Температуру тримають протягом приблизно 3 годин, причому хід реакції контролюють ВЕРХ. Наприкінці реакції концентрація глюкози становить 420 г/кг.

III. Штам ATCC13032lysC^{fb}

В деяких наведених нижче прикладах використовують модифікований штам *Corynebacterium glutamicum*, який під назвою ATCC13032lysC^{fb} описаний в WO 05/059144.

Приклад 1

Розріджений та оцукрений гідролізат кукурудзяної муки, одержаний відповідно до пункту II, використовують у дослідженнях в хитних колбах при додаванні *Corynebacterium glutamicum*.

Штам

Використовують модифікований дикий тип, що містить аспартокіназу ATCC13032lysC^{fb} із порушеним зворотнім зв'язком.

Одержання затравки

Клітини після нанесення на стерильний CM+CaAc-агар (склад: див. таблицю 1; 20 хвилин при 121 °С) протягом ночі інкубують при 30 °С. Потім клітини зіскоблюють з планшет та суспендують у соляному розчині. 25 мл середовища (див. таблицю 2) поміщають в 250 мл колбу Ерленмейера з двома дефлекторами та як затравку додають відповідно таку кількість одержаної таким чином суспензії клітин, щоб оптична густина OD₆₁₀ становила від 0,5 до 610 нм.

Таблиця 1:

Склад CM+CaAc-агарових планшет

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

Одержання ферментаційного розчину

Склад середовища колби наведений в таблиці 2. Дослідження здійснюють при триразовому вимірюванні.

Таблиця 2:

Середовище у колбі

| | |
|---|------------|
| Гідролізат кукурудзяної муки | 143 г/л |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 20 г/л |
| карбамід | 5 г/л |
| KH ₂ PO ₄ | 0,113 г/л |
| K ₂ HPO ₄ | 0,138 г/л |
| ACES | 52 г/л |
| MOPS | 21 г/л |
| Гідролізат кукурудзяної муки | 143 г/л |
| лимонна кислота × H ₂ O | 0,49 г/л |
| 3,4-дигідроксибензойна кислота | 3,08 мг/л |
| NaCl | 2,5 г/л |
| KCl | 1 г/л |
| MgSO ₄ × 7 H ₂ O | 0,3 г/л |
| FeSO ₄ × 7 H ₂ O | 25 мг/л |
| MnSO ₄ × 4-6 H ₂ O | 5 мг/л |
| ZnCl ₂ | 10 мг/л |
| CaCl ₂ | 20 мг/л |
| H ₃ BO ₃ | 150 мкг/л |
| CoCl ₂ × 6 H ₂ O | 100 мкг/л |
| CuCl ₂ × 2 H ₂ O | 100 мкг/л |
| NiSO ₄ × 6 H ₂ O | 100 мкг/л |
| Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O | 25 мкг/л |
| біотин (віт. H) | 1050 мкг/л |
| тіамін × HCl (віт. B ₁) | 2100 мкг/л |
| нікотинамід | 2,5 мг/л |
| пантотенова кислота | 125 мг/л |
| ціанокобаламін (віт. B ₁₂) | 1 мкг/л |
| 4-амінобензойна кислота (ПАБА; віт. H ₁) | 600 мкг/л |
| фолієва кислота | 1,1 мкг/л |
| піридоксин (віт. B ₆) | 30 мкг/л |
| рибофлавін (віт. B ₂) | 90 мкг/л |
| CSL | 40 мл/л |
| pH* | 6,85 |

* значення встановлене з використанням розрідженої водного розчину NaOH

Після введення затравки колби протягом 48 годин інкубують при 30 °С при струшуванні (200 хв⁻¹) у зволоженій хитній шафі. Після завершення ферментації визначають вміст глюкози та 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).

Приклад 2

Розріджений та оцукрений гідролізат кукурудзяної муки, одержаний відповідно до пункту II, використовують у дослідженнях в хитних колбах при додаванні *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 (аналогічно ISO 505), однак без використання інтегрованих *phyA*-експресійних касет.

Одержання затравки

В 20 мл попереднього живильного середовища (див таблицю 3) 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⁻¹) у зволоженій хитній шафі.

Таблиця 3:

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 ₂ PO ₄ | 1,0 г/л |
| MgSO ₄ × 7 H ₂ O | 0,5 г/л |
| ZnCl ₂ | 30 мг/л |
| CaCl ₂ | 20 мг/л |
| MnSO ₄ × 1 H ₂ O | 9 мг/л |
| FeSO ₄ × 7 H ₂ 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 4) в 250 мл колбі Ерленмейера з дефлектором як затравку відповідно вводять 5 мл вихідної культури.

Одержання ферментаційного розчину

Нижче в таблиці 4 зазначений склад середовища у колбі. Із кожного використовують дві колби.

Таблиця 4:

Середовище у колбі

| | |
|--|---------------|
| Гідролізат кукурудзяної муки | 166 г/л |
| пептон із касеїну | 25,0 г/л |
| дріжджовий екстракт | 12,5 г/л |
| гідролізат кукурудзяної муки | 166 г/л |
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 г/л |
| K ₂ SO ₄ | 2,0 г/л |
| MgSO ₄ × 7 H ₂ O | 0,5 г/л |
| ZnCl ₂ | 30 мг/л |
| CaCl ₂ | 20 мг/л |
| MnSO ₄ × 1 H ₂ O | 9 мг/л |
| FeSO ₄ × 7 H ₂ 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⁻¹) у зволоженій хитній шафі. Після завершення ферментації визначають активність фітази за допомогою фітинової кислоти як субстрату та відповідно рівні активності фітази (стандарт 0,6 од/мл) в 250 мМ буферного розчину оцтової кислоти/ацетату натрію/Tween20 (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 0,32N H₂SO₄, 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.