



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95932 (13) C2

(51) МПК

C12P 13/02 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ФЕРМЕНТАТИВНЕ ОДЕРЖАННЯ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК

1

2

(21) а200808567

(22) 27.11.2006

(24) 26.09.2011

(86) PCT/EP2006/068926, 27.11.2006

(31) 10 2005 056 668.5

(32) 28.11.2005

(33) DE

(46) 26.09.2011, Бюл.№ 18, 2011 р.

(72) ПОМПЕЮС МАРКУС, DE/KR, ФРЕЄР ШТЕ-
ФАН, DE, ЛОШАЙДТ МАРКУС, DE, ЦЕЛЬДЕР
ОСКАР, DE, БОЙ МАТТИАС, DE

(73) БАСФ SE, DE

(56) WO A 200206663, 29.08.2002.

WO A 2004113551, 29.12.2004.

DE A1 3731293, 06.04.1989.

WO A 2005059144, 30.06.2005.

WO A 9855599, 10.12.1998.

JP A 2001275693, 09.10.2001.

(57) 1. Спосіб одержання щонайменше однієї органічної сполуки, що містить щонайменше 3 атоми вуглецю або щонайменше 2 атоми вуглецю та щонайменше 1 атом азоту, яку 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 жирних кислот; діолів, що містять від 4 до 10 атомів вуглецю, багатоатомних спиртів, що містять 3 або більше гідроксильних груп, довголанцюгових спиртів, що містять щонайменше 4 атоми вуглецю, вуглеводів, ароматичних сполук, вітамінів, провітамінів, кофакторів, нутрицевтичних засобів, білків, каротиноїдів, кетонів, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, лактонів, біополімерів та циклодекстринів, шляхом ферментації, що включає такі стадії:

а1) подрібнення крохмаловмісної сировини, яку вибирають з зерен зернових культур, з одержанням подрібненого матеріалу, який містить щонайменше 20 мас. % твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що входять до складу подрібнених зерен зернових культур та не містять крохмаль;

а2) суспендування подрібненого матеріалу у водній рідині та ферментативний гідроліз крохмалов-

місного компонента в подрібненому матеріалі та, в разі потреби, подальше оцукрювання, при цьому одержують першу рідину (1), що містить моно- або олігосахариди та тверді компоненти крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль; та

б) додавання рідини (1), що містить моно- або олігосахариди, разом із здатними до метаболічного розщеплення моно-, ди- та/або олігосахаридами або композицією, що містить здатні до метаболічного розщеплення моно-, ди- та/або олігосахариди у концентрації щонайменше 50 мас. % та яка в основному не містить нерозчинних у воді твердих речовин, у ферментаційне середовище, що містить мікроорганізм, здатний перевиробляти органічну сполуку, в умовах ферментації.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що загальна концентрація моно-, ди- та олігосахаридів у одержаній на стадії а2) рідині (1) становить від 100 до 400 г/кг.

3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що кількість моно-, ди- та/або олігосахаридів, введена шляхом додавання рідини (1) у ферментацію, становить від 40 до 95 мас. % від загальної кількості введених у ферментацію моно-, ди- та олігосахаридів.

4. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що загальну концентрацію моно-, ди- та олігосахаридів у першій рідині (1) підвищують на щонайменше 50 г/кг шляхом додавання здатних до метаболічного розщеплення моно-, ди- та/або олігосахаридів або шляхом додавання середовища, яке містить здатні до метаболічного розщеплення моно-, ди- та/або олігосахариди у концентрації щонайменше 50 мас. % та в основному не містить нерозчинних у воді твердих речовин.

5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що загальну концентрацію моно-, ди- та олігосахаридів у рідині (1) підвищують до 450-600 г/кг.

6. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що як композицію, що містить здатні до метаболічного розщеплення моно- або олігосахариди, використовують побічний продукт процесу одержання цукру, який містить глюкозу та/або сахарозу та, в разі потреби, декстрини.

7. Спосіб за п. 6, який **відрізняється** тим, що як композицію, що містить здатні до метаболічного

(13) C2

(11) 95932

(19) UA

розщеплення моно-, ди- та/або олігосахариди, використовують меласу із процесу одержання бурякового цукру.

8. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що на стадії a2) щонайменше одну частину одержаного на стадії a1) подрібненого матеріалу гідролізують шляхом безперервного або періодичного додавання у водну рідину в умовах гідролізу.

9. Спосіб за одним із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що на стадії a2) суспензію подрібненого матеріалу шляхом введення водяної пари у суспензію нагрівають до температури, вищої за температуру клейстеризації крохмалю, що входить до складу подрібненого матеріалу.

10. 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 полігідроксіалканоати.

11. 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*.

12. Спосіб за п. 10 або 11, який **відрізняється** тим, що використовуваний для ферментації мікроорганізм вибирають із природних або рекомбінантних мікроорганізмів, що перевиробляють амінокислоти.

13. Спосіб за п. 11 або 12, який **відрізняється** тим, що мікроорганізм являє собою штам роду *Corynebacterium*.

14. Спосіб за п. 10 або 11, який **відрізняється** тим, що використовуваний для ферментації мікроорганізм вибирають із природних або рекомбінантних мікроорганізмів, що перевиробляють фермент.

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

16. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що органічну сполуку збіднюють або виділяють із ферментаційного розчину та після цього в значній мірі видаляють леткі компоненти ферментаційного розчину, при цьому одержують тверду або напівтверду композицію білків.

17. Спосіб за одним із пп. 1-15, який **відрізняється** тим, що леткі компоненти ферментаційного розчину без попереднього виділення або збіднення нелеткого продукту метаболізму мікроорганізмів та, в разі потреби, без попереднього відділення твердих компонентів видаляють щонайменше частково, при цьому одержують тверду композицію нелеткого продукту метаболізму мікроорганізмів.

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

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

Для таких загальновідомих способів ферментації мікроорганізмами залежно від різних умов здійснення способів використовують різні джерела вуглецю: від чистої сахарози до бурякової і тростинної меласи, так званих "high test molasses" (інвертної тростинної меласи) аж до глюкози із гідролізатів крохмалю. У випадку біотехнологічного одержання L-лізину слід назвати також оцтову

кислоту та етанол як використовувані у промислових масштабах спів субстрати (Pfefferle et al., *Biotechnological Manufacture of Lysine, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 79(2003), 59-112).

Виходячи із зазначених джерел вуглецю, були розроблені різні методи та способи ферментативного одержання на основі цукру продуктів метаболізму мікроорганізмів. На прикладі L-лізину ці 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 розрідити та оцукрити перед його використанням у ролі джерела вуглецю в процесі ферментації. З цією метою крохмаль одержують із природного крохмалювмісного 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", NREUTP-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 принципним 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, відділяють перед розрідженням/оцукрюванням одержаного крохмалю та подальшою ферментацією. При здійсненні такого способу одержують середню концентрацію цукру. Подібний спосіб описаний в JP 2001/309751 для одержання кормової добавки, що містить амінокислоту.

Підвищені концентрації цукру у 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 2005042541.0) даного заявника. В деяких випадках спостерігається інгібування або уповільнення процесу розмноження мікроорганізмів.

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

Несподівано з'ясували, що описані тут проблеми рівня техніки можна вирішити таким чином: спочатку шляхом подрібнення, розрідження та оцукрювання крохмаловмісної сировини без попереднього виділення твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль, одержують перше цукровмісне рідке середовище (1), яке разом із здатними до розщеплення моно-, ди- або олігосахаридами або із композицією, що містить здатні до розщеплення моно- або олігосахариди у концентрації щонайменше 50 мас. % та яка в основному не містить нерозчинні у воді тверді речовини, піддають ферментації.

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

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

a2) суспендування подрібненого матеріалу у водній рідині та гідроліз крохмаловмісного компоненту в подрібненому матеріалі шляхом ферментативного розрідження та, в разі потреби, подальшого оцукрювання, при цьому одержують першу рідину (1), що містить моно- або олігосахариди; та

b) додавання рідини (1), що містить моно- або олігосахариди, разом із здатними до розщеплення моно-, ди- або олігосахаридами або композицією, що містить здатні до розщеплення моно-, ди- або олігосахариди у концентрації щонайменше 50 мас. % та яка в основному не містить нерозчинні у воді тверді речовини, у ферментаційне середовище, що містить мікроорганізм, здатний перевиробляти органічну сполуку, в умовах ферментації.

Застосування одержаної ферментативним гідролізом рідини (1), що містить моно- або олігосахариди, сприяє значному зменшенню витрат при ферментативному одержанні органічних сполук. Крім того завдяки паралельному додаванню здатних до розщеплення цукрів (тобто здатних до розщеплення моно-, ди- або олігосахаридів) у концентрованій формі вдається уникнути небажаного розрідження ферментаційного розчину. До того ж завдяки способу згідно з винаходом можна уникнути проблем із в'язкістю, які можуть виникати при розрідженні крохмаловмісної сировини при високих концентраціях подрібненого матеріалу. Крім того таким чином вдається уникати проблем при розмноженні мікроорганізму.

Тут та надалі для позначення рідини (1), що містить моно- або олігосахариди, використовують синонімічні поняття "рідина (1)" та "рідке середовище (1)".

Як крохмаловмісну сировину для здійснення способу згідно з винаходом використовують передусім сухі зернові культури або насіння, які у висушеному стані характеризуються вмістом крохмалю щонайменше 40 мас. %, переважно щонайменше 50 мас. %. Їх вибирають серед багатьох культивованих на сьогоднішній день у великих масштабах зернових, таких як кукурудза, пшениця, овес, жито, ячмінь, тритикале, рис, а також в культурах цукрового буряка і картоплі 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 рідкого середовища (1) на стадії a1) відповідну крохмаловмісну сировину подрібнюють з або без додавання рідини, наприклад, води, переважно без додавання рідини. Крім того сухе подрібнення може бути комбіноване з подальшим післяреакційним подрібненням.

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

Шляхом подрібнення встановлюють необхідний для подальшої стадії способу розмір зерна. При цьому вигідним виявився варіант, коли використовують подрібнені частинки, тобто гранульні компоненти, одержаного при подрібненні, зокрема при сухому подрібненні, на стадії a1) подрібненого матеріалу, розмір яких становить від 100 до 630 мкм у кількості від 30 до 100 мас. %, переважно від 40 до 95 мас. % та особливо переважно від 50 до 90 мас. %. Переважно одержаний подрібне-

ний матеріал містить 50 мас. % подрібнених частинок, розмір яких становить понад 100 мкм. Як правило, щонайменше 95 мас. % подрібнених частинок мають розмір менше 2 мм. При цьому розмір частинок визначають ситовим аналізом з використанням вібраційного аналізатора. Вигідним для одержання високих кількостей продукту на виході є незначний розмір частинок. Однак надто маленький розмір частинок може викликати проблеми, зокрема через утворення грудок/агломерацію, в ході перемішування подрібненого матеріалу під час розрідження або при обробці, наприклад, при сушці твердих речовин після ферментації.

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

Згідно з винаходом використовуваний для одержання рідкого середовища (1) подрібнений матеріал містить щонайменше частину, переважно щонайменше 20 мас. %, зокрема щонайменше 50 мас. %, особливо переважно щонайменше 90 мас. % та найбільш переважно щонайменше 99 мас. % твердих компонентів, що входять до складу подрібнених зерен зернових культур та не містять крохмаль, відповідно до ступеню подрібнення. Щодо крохмаловмісних компонентів подрібненого мате-

ріалу (та кількості моно-, ди- або олігосахаридів у рідкому середовищі (1)), то вміст твердих компонентів, що не містять крохмаль, у подрібненому матеріалі становить переважно щонайменше 10 мас. % та зокрема щонайменше 15 мас. %, наприклад, від 15 до 75 мас. %, зокрема від 20 до 60 мас. %.

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

З цією метою подрібнений матеріал спочатку 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.

Кількість подрібненого матеріалу та водної рідини, як правило, вибирають таким чином, що шляхом гідролізу одержують водне рідке середовище (1), в якому загальна концентрація моно- ди- та/або олігосахаридів становить від 100 до 750 г/кг, переважно від 150 до 700 г/кг, зокрема від 200 до 650 г/кг. Таким чином подрібнений матеріал використовують зазвичай у кількості від 150 до 800 г/кг, часто від 200 до 750 г/кг та зокрема від 250 до 700 г/кг, у перерахунку на загальну вагу суспензії (пульпи).

У переважній формі виконання винаходу кількість подрібненого матеріалу та водної рідини вибирають таким чином, що шляхом гідролізу одержують водне рідке середовище (1), в якому загальна концентрація моно- ди- та/або олігосахаридів становить від 100 до 400 г/кг, переважно від 150 до 350 г/кг та зокрема від 200 до 300 г/кг. Таким чином подрібнений матеріал використовують зазвичай у кількості від 150 до 550 г/кг, часто від 200 до 500 г/кг та зокрема від 250 до 450 г/кг, у перерахунку на загальну вагу суспензії (пульпи). Загалом для одержання вищою загальною концентрацією моно-, ди- та/або олігосахаридів, наприклад, від понад 400 г/кг до 700 г/кг, зокрема від 450 до 650 г/кг або від 500 до 650 г/кг, можна використовувати і більші кількості подрібненого матеріалу.

Для ферментативного гідролізу крохмаловмісного компоненту подрібненого матеріалу, як правило, спочатку здійснюють розрідження подрібненого матеріалу в присутності ферменту, що розріджує крохмаль, зазвичай α -амілази. Крім того можна використовувати і інші активні та стабільні в умовах реакції ферменти, що розріджують крохмаль.

Для розрідження крохмаловмісного компоненту подрібненого матеріалу загалом можуть бути використані всі ферменти, що розріджують крохмаль, зокрема α -амілази (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. При-

датні для розрідження α -амілази наявні у продажу, наприклад, як продукти фірми Novozymes під назвою Termamyl 120 L, тип L; або фірми Genencor під назвою Spezyme. Для розрідження може бути застосована також комбінація різних α -амілаз.

При цьому одержують водне середовище, що містить розріджений крохмаловмісний компонент подрібненого матеріалу, зазвичай олігосахариди, що містять, як правило, від 3 до 18, зокрема від 6 до 12 моносхаридних одиниць, зокрема одиниць глюкози, а також компоненти використовуваного подрібненого матеріалу, що не містять крохмаль, зокрема тверді компоненти використовуваного для розрідження подрібненого матеріалу, що не містять крохмаль.

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

α -амілазу (або відповідно використовуваний для розрідження крохмалю фермент) можна з самого початку помістити у реакційну посудину або додавати в ході стадії a2). Переважаю частину необхідної на стадії a2) α -амілази додають на початку стадії a2) або ця кількість уже існує в реакторі. Загальна кількість 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 крохмаловмісної сировини.

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

Для оптимальної дії α -амілази (або відповідно використовуваного для розрідження крохмалю ферменту) стадію a2) переважно принаймні час від часу здійснюють при значенні pH у оптимальному діапазоні для розріджувального ферменту, часто при значенні pH у слабо кислому діапазоні, зокрема від 4,0 до 7,0, особливо переважно від 5,0 до 6,5, причому зазвичай відповідне значення pH встановлюють перед або на самому початку стадії a2); це значення pH контролюють в ході процесу розрідження та, в разі потреби, регулюють. Встановлюють значення pH переважно за допомогою розріджених мінеральних кислот, таких як H₂SO₄ або H₃PO₄, або за допомогою розріджених лугів, таких як NaOH або KOH.

У переважній формі виконання винаходу для розрідження крохмаловмісного компоненту подрібненого матеріалу на стадії a2) у водну рідину безперервно або періодично додають щонайменше частину подрібненого матеріалу. Переважаю в ході розрідження, однак до здійснення можливого оцукрювання у реактор додають щонайменше 40 мас. %, зокрема щонайменше 50 мас. % та особливо переважно щонайменше 55 мас. %. Часто витратна кількість не перевищує 90 мас. %, зокрема 85 мас. % та особливо переважно 80 мас. %. Переважаю частину використовуваного подрібненого матеріалу додають у реактор в умовах, які встановлюють для здійснення розрідження. Додавання можна здійснювати періодично, тобто кількома окремими порціями, які складають переважно не більше 30 мас. %, особливо переважно не більше 20 мас. %, наприклад, від 1 до 30 мас. % та зокрема від 2 до 20 мас. % загальної кількості подрібненого матеріалу, що підлягає розрідженню, або безперервно. Важливим у цій формі виконання є те, що на початок розрідження лише частина подрібненого матеріалу, переважно не більше 60 мас. %, зокрема не більше 50 мас. % та особливо переважно не більше 45 мас. % подрібненого матеріалу, знаходиться у реакторі, а іншу частину подрібненого матеріалу додають в ході розрідження.

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

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

Відповідно до іншої переважної форми виконання винаходу періодичне або безперервне, зокрема порційне додавання частини подрібненого матеріалу на стадії a2) здійснюють таким чином, що в'язкість рідкого середовищу становить максимум 20 Пас, переважно максимум 15 Пас та особливо переважно максимум 8 Пас. Для постійного контролю в'язкості вигідним виявився той варіант, у якому щонайменше 25 мас. %, переважно що-

найменше 35 мас. % та особливо переважно щонайменше 50 мас. % від загальної кількості використовуваного подрібненого матеріалу додають при температурі, вищій за температуру желатинування крохмалю, що входить до складу подрібненого матеріалу. Крім того контроль в'язкості можна також підтримувати шляхом порційного додавання щонайменше одного ферменту, який розріджує крохмаль, переважно α -амілази, та/або щонайменше одного оцукрювального ферменту, переважно глюкоамілази.

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

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

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

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

давання невикористаної при приготуванні суспензії часткової кількості подрібненого матеріалу можна здійснювати безперервно в ході процесу розрідження. При додаванні температура переважно має бути вищою за температуру желатинування крохмалю.

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

Для повного розщеплення крохмалю до декстринів реакційну суміш доти тримають при встановленій температурі або, в разі потреби, надалі нагрівають, доки тест на виявлення крохмалю йодом або, в разі потреби, інший тест на виявлення крохмалю не даватиме негативних результатів або щонайменше в основному не буде негативним. В разі потреби, з цією метою у реакційну суміш можна додавати ще одну або кілька частин 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 крохмаловмісної сировини.

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

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

Введення водяної пари у суспензію здійснюють, як правило, таким чином, щоб пара при надлишковому тиску, переважно від 1 до 10 або 11 бар, зокрема від 1,5 до 5 бар, та переважно при більш високій швидкості проникала у суспензію.

Внаслідок введення водяної пари суспензія моментально нагрівається до температури вище 90°C, тобто до температури, вищою за температуру клейстеризації.

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

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

Такі установки відомі з рівня техніки під назвою вакуум-апарат, наприклад, представлена в "The Alcohol Textbook", розділ 2, loc. cit, 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 колони. При цьому суспензію на виході із установки для обробки парою завантажують у верхній частині колони та вивантажують у нижній частині. Відповідно до іншої форми виконання винаходу післяреакційна зона має трубчасту форму.

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

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

Для стабілізації використовуваних ферментів, в разі потреби, концентрацію іонів Ca^{2+} , наприклад, за допомогою CaCl_2 , встановлюють на специфічному для ферментів оптимальному рівні. Придатні значення концентрації фахівці визначають при проведенні звичайних досліджень. Якщо, наприклад, як α -амілазу використовують термамил, 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 цією 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 використуваного крохмаловмісної сировини.

Таким чином одержують водний крохмаловмісний 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 використуваного для розрідження подрібненого матеріалу, що не містять крохмаль.

Після завершення розрідження крохмалю оцукрювання декстринів, що входять до складу рідкого середовища, тобто їх розщеплення до глюкози, можна здійснювати безперервно або періодично відомими способами. Розріджене середовище зазвичай повністю оцукрюють у спеціальному резервуарі для оцукрювання перед його використанням, наприклад, на іншій стадії ферментації.

У першій формі виконання винаходу перед майбутньою ферментацією здійснюють лише часткове оцукрювання. Так, наприклад, можна діяти таким чином: частину декстринів, що містяться у рідкому середовищі, наприклад, від 10 до 90 мас. % та зокрема від 20 до 80 мас. %, у перерахунку на загальну вагу декстринів (або відповідно первинного крохмалю), оцукрюють, а одержане цукровмісне рідке середовище використовують у ферментації. Після цього у ферментаційному середовищі можна здійснювати ще одне оцукрювання *in situ*. Крім того оцукрювання можна здійснювати без використання окремого резервуару для оцукрювання безпосередньо у ферментері (*in situ*).

Перевагою оцукрювання *in-situ*, тобто часткового або повного оцукрювання у ферментері, 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.

Оцукрювання декстринів (тобто олігосахаридів) у розрідженому розчині крохмалю здійснюють ферментативним способом, тобто за допомогою щонайменше одного здатного оцукрювати декстрини ферменту. При цьому 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 сухого 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.

Щонайменше один оцукрювальний фермент, зокрема щонайменше одну глюкоамілазу зазвичай додають у одержане в результаті розрідження

декстринвмісне рідке середовище 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 використуваної крохмаловмісної сировини.

Якщо оцукрювання здійснюють у ферментері, то розріджений розчин крохмалю, як правило, охолоджують до температури ферментації, тобто до 32-37°C, перед подачею у ферментер. У цьому випадку глюкоамілазу (або відповідно щонайменше один оцукрювальний фермент) для оцукрювання додають безпосередньо у ферментаційний розчин. При цьому оцукрювання розрідженого крохмалю відповідно до стадії a2) здійснюють паралельно із розщепленням цукру мікроорганізмами.

У випадку оцукрювання у резервуарі для оцукрювання розріджений розчин крохмалю зазвичай охолоджують до температури оцукрювального ферменту або трохи нижче, наприклад, до 50-70°C, переважно до 60-65°C, або відповідним чином регулюють його температуру та потім додають глюкоамілазу.

Переважно перед додаванням оцукрювального ферменту, зокрема глюкоамілази, значення pH рідкого середовища встановлюють в оптимальному діапазоні значень зони активності використовуваної глюкоамілази, переважно у діапазоні від 3,5 до 6,0; особливо переважно від 4,0 до 5,5 та найбільш переважно від 4,0 до 5,0. Однак можливо також зокрема при здійсненні оцукрювання безпосередньо у ферментері встановлювати значення pH, що виходить за межі зазначених діапазонів, наприклад, від більше 6,0 до 8,0. Це загалом може виявитися вигідним, наприклад, при ферментативному одержанні лізину, пантотенату та вітаміну B₂, незважаючи на обмежену активність стандартних глюкоамілаз у цьому діапазоні значень pH, або необхідним, враховуючи встановлювані умови ферментації.

Відповідно до переважної форми виконання винаходу оцукрювання здійснюють у спеціальному оцукрювальному резервуарі. З цією метою у розрідженому розчині крохмалю встановлюють оптимальну для ферменту або трохи нижчу температуру та значення pH у описаному вище оптимальному для ферменту діапазоні.

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 цукровмісного рідкого середовища (1), як правило, використовують подрібнений матеріал, який містить щонайменше частину або всі компоненти крохмаловмісної сировини (тобто виділення твердих компонентів крохмаловмісної сировини, що не містять крохмаль, не здійснюють або здійснюють неповністю),

то одержане рідке середовище (1) також містить частину або всі тверді компоненти 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 на стадії а2) у рідке середовище вигідно додавати щонайменше одну фітазу до подачі цукорвмісного рідкого середовища на стадію ферментації.

Додавання фітази можна здійснювати до, під час або після розрідження або оцукрювання, якщо вона має необхідну термостійкість.

При цьому можуть бути використані будь-які фітази, якщо їх активність в умовах реакції обмежується щонайбільше лише незначним чином. Перевагу надають фітазам, температурна стабільність (Т50) яких становить $>50^{\circ}\text{C}$ та особливо переважно $>60^{\circ}\text{C}$.

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 у реакційну суміш в процесі одержання цукорвмісного рідкого середовища можна додавати також 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.

Завдяки описаному тут здійсненню стадій а1) та а2) залежно від того, здійснюють оцукрювання чи ні, одержують рідке середовище, що містить декстрин або відповідно моно- або дисахарид, причому загальна концентрація моно-, ди- та/або олігосахаридів знаходиться у лписаних вище діапазонах.

Під цукрами, що входять до складу рідкого середовища (1) після оцукрювання, мають на увазі зокрема глюкозу, крім того рідке середовище може містити також і інші відмінні від глюкози гексози та пентози, наприклад, фруктозу, манозу, галактозу, сорбозу, ксилозу, арабінозу та рибозу. Вміст відмінних від глюкози моносахаридів 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. Переважно моносахариди цукорвмісного рідкого середовища містять глюкозу у кількості щонайменше 60 мас. %, часто щонайменше 70 мас. %, зокрема щонайменше 80 мас. % та особливо щонайменше 85 мас. %, у перерахунку на загальну кількість цукру, що входить до складу цукорвмісного рідкого середовища. Зазвичай вміст глюкози становить від 75 до 99,9 мас. %, зокрема від 80 до 99 мас. % та

особливо від 85 до 97 мас. %, у перерахунку на загальну кількість цукру, що входить до складу цукорвмісного рідкого середовища. Якщо оцукрювання не здійснюють, то вміст декстринів у моно-, ди- та олігосахаридах, що входять до складу середовища (1), в основному відповідає вмісту глюкози.

Якщо оцукрювання не здійснюють, то здатний до розщеплення еквівалент глюкози в основному існує у формі олігосахаридів, зокрема декстринів. Основним компонентом цих олігосахаридів або відповідно декстринів є зазвичай глюкоза, причому середовище може містити також незначні кількості моно- та/або дисахаридів та олігосахаридних одиниць, що складаються з інших моносахаридних одиниць. Зазвичай цукорвмісні компоненти рідкого середовища (1), тобто моно-, ди- та олігосахариди, містять олігосахариди, зокрема дектрини, у кількості щонайменше 60 мас. %, часто щонайменше 70 мас. %, зокрема щонайменше 80 мас. %, особливо щонайменше 90 мас. %, тобто вміст моно- та дисахаридів становить менше 40 мас. %, часто менше 30 мас. %, зокрема менше 20 мас. % та особливо менше 10 мас. %. Зазвичай вміст глюкози, у вільній або зв'язаній формі, серед еквівалентів глюкози середовища (1) становить від 50 до 99 мас. %, зокрема від 75 до 97 мас. % та особливо від 80 до 95 мас. %, у перерахунку на загальну кількість еквівалентів глюкози.

Згідно з винаходом подальшу ферментацію здійснюють як з використанням рідкого середовища (1), так і відмінного від нього джерела здатних до розщеплення моно-, ди- та/або олігосахаридів (які надалі позначають також як джерело цукру). Використовувані з цією метою моно-, ди- та/або олігосахариди можуть бути застосовані як такі або у формі композиції, що містить здатні до розщеплення моно-, ди- та/або олігосахариди у концентрації щонайменше 50 мас. %, переважно у концентрації щонайменше 60 мас. %, у перерахунку на загальну вагу середовища, та які на відміну від водного рідкого середовища (1) в основному не містять нерозчинні у воді тверді речовини.

Моно-, ди- та/або олігосахариди, що входять до складу джерела цукру, переважно вибирають із моносахаридів, як правило, гексоз та/або пентоди, наприклад, глюкози, фруктози, манози, галактози, сорбози, ксилози, арабінози та рибози, зокрема із глюкози, фруктози та галактози, та дисахаридів, таких як сахароза, мальтоза, лактоза, зокрема сахароза. Придатними є також суміші моносахаридів та дисахаридів, а також олігосахариди з високим вмістом вбудованої глюкози та їх суміші з моносахаридами та/або дисахаридами.

Прикладами композицій, що містять здатні до розщеплення моно-, ди- та/або олігосахариди у концентрації щонайменше 50 мас. % та в основному не містять нерозчинні у воді тверді речовини, є 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.

Перевагу надають зокрема речовинам, що містять переважно моно- та/або дисахариди, зокрема глюкозу та/або сахарозу, а також сумішам, що містять глюкозу та/або сахарозу та олігосахариди з високим вмістом вбудованої глюкози, наприклад, глюкозі, сахарозі, сиропам глюкози, сиропам сахарози, згущеним сокам та меласам.

Моно-, ди- та/або олігосахариди або відповідно композиції, що їх містять, як і рідке середовище (1), можуть бути використані як для приготування ферментаційного середовища (періодична фаза), так і для підживлення в ході ферментації, якщо її здійснюють напівперіодично.

Загальна кількість введених моно-, ди- та/або олігосахаридів у результаті додавання рідкого середовища (1) на стадію ферментацію становить переважно щонайменше 40 мас. %, зокрема щонайменше 50 мас. %, особливо переважно щонайменше 60 мас. %, наприклад, від 40 до 95 мас. %, зокрема від 50 до 90 мас. % та особливо від 60 до 90 мас. % від загальної кількості введених у ферментацію моно-, ди- та олігосахаридів.

Рідке середовище (1) та моно-, ди- та/або олігосахариди або відповідно композиції, що їх містять, можна подавати на стадію ферментації окремо один від іншого або разом.

Відповідно до переважної форми виконання винаходу рідке середовище (1) та моно-, ди- та/або олігосахариди або відповідно композицію, що їх містить, перед введенням на стадію ферментації змішують між собою. Таким чином при використанні низько концентрованого рідкого середовища, в якому загальна концентрація моно-, ди- та олігосахаридів становить, як правило, від 100 до 400 г/кг, підвищують загальний вміст цукру в одержаному відповідно до стадій а1) та а2) цукорвмісному рідкому середовищі (1), а саме переважно на щонайменше 50 г/кг, зокрема на щонайменше 100 г/кг, особливо на щонайменше 150 г/кг, наприклад, на 50-300 г/кг, зокрема на 100-250 г/кг та особливо на 120-200 г/кг до понад 40 мас. %, переважно до щонайменше 45 мас. %, зокрема до щонайменше 50 мас. % та особливо переважно до щонайменше 55 мас. %, у перерахунку на загальну вагу.

Після додавання цих джерел цукру у рідке середовище (1) одержане рідке середовище характеризується вмістом сухої речовини переважно від 45 до 80 мас. % та особливо переважно від 50 до 75 мас. % або від 55 до 75 мас. %, у перерахунку на загальну вагу. При цьому вигідно регулювати в'язкість рідкого середовища (1), наприклад, за допомогою встановлення температури, таким чином, щоб показники не перевищували максимум 20 Па·с, особливо переважно максимум 15 Па·с та найбільш переважно максимум 8 Па·с.

Відповідно до ще однієї переважної форми виконання винаходу моно- та/або дисахариди додають у перше рідке середовище (1) у формі побічного продукту одержання цукру, що містить глюкозу або сахарозу. Прикладами є меласи, які утворюються при одержанні цукру із тростинного або зокрема бурякового цукру.

Згідно з винаходом одержане на стадіях а1) та а2) рідке середовище (1) та відмінні від нього дже-

рела цукру подають на стадію ферментації, де вони служать для культивування мікроорганізмів. В ході ферментації виробляються продукти метаболізму мікроорганізмів.

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 рідке середовище (1) або звичайне джерело цукру, тобто здатні до розщеплення моно-, ди- та/або олігосахариди або композиція, що містить здатні до розщеплення моно-, ди- та/або олігосахариди у концентрації щонайменше 50 мас. % та яка зазвичай в основному не містить нерозчинні у воді тверді речовини або їх суміші, в разі потреби, після розрідження водою та додавання звичайних компонентів середовища, таких як буферні розчини, живильні солі, джерела азоту, наприклад, сульфат амонію, карбамід і т.п., комплексні компоненти живильного середовища, що містять амінокислоти, такі як дріжджові екстракти, пептони, CSL та подібні, можна інокулювати бажаним мікроорганізмом та розмножувати його в умовах ферментації, доки концентрація мікроорганізмів не досягне бажаного для ферментації постійного значення. При цьому цукор, що міститься у рідкому середовищі (1), розщеплюють, в результаті чого утворюється бажаний продукт метаболізму (так званий періодичний метод або періодична фаза).

При напівбезперервному здійсненні способу шляхом подачі іншого одержаного способом згідно з винаходом рідкого середовища (1) та відмінного від нього джерела цукру, зокрема шляхом подачі рідкого середовища, одержаного змішуванням рідкого середовища (1) та відмінного від нього джерела цукру, процес ферментації продовжують, а перевироблений мікроорганізмами продукт їх метаболізму насичують у ферментаційному розчині, причому продукт метаболізму може існувати як у клітинах мікроорганізму, так і у водній фазі ферментаційного середовища.

Переважно ферментацію здійснюють напівбезперервно. При цьому діють таким чином: спочатку мікроорганізм при використанні цукорвмісного рідкого середовища, наприклад, при використанні рідкого середовища (1) або іншого джерела цукру розмножують до досягнення бажаної концентрації мікроорганізмів у ферментері. Після цього рідке середовище (1) разом з іншим джерелом цукру, тобто здатними до розщеплення моно-, ди- та/або олігосахариди або середовищем, що містить здатні до розщеплення моно-, ди- та/або олігосахариди у концентрації щонайменше 50 мас. % та в основному не містить нерозчинні у воді тверді речовини, подають у ферментер. Таким чином підтримують процес ферментації та сприяють насиченню перевиробленого мікроорганізмами

продукту їх метаболізму у ферментаційному розчині (див. вище). При цьому об'ємне співвідношення доданого цукровмісного рідкого середовища (1) і іншого джерела цукру та існуючого у ферментері середовища, що містить мікроорганізми, становить загалом від приблизно 1:10 до 10:1 та переважно від приблизно 1:5 до 5:1, особливо від 1:1 до 5:1. Зокрема за допомогою швидкості подачі цукровмісного рідкого середовища можна регулювати вміст цукру у ферментаційному розчині. Як правило, швидкість подачі встановлюють такою, щоб вміст моносахаридів у ферментаційному розчині становив від >0 мас. % до приблизно 5 мас. % та зокрема не перевищував значення 3 мас. %.

Одержане на стадії a2) цукровмісне рідке середовище або його суміш з іншим джерелом цукру перед початком ферментації, в разі потреби, можна стерилізувати, причому мікроорганізми зазвичай вбивають термічним або хімічним способом. З цією метою цукровмісне середовище зазвичай нагрівають до температури вище 80°C. Знищення або лізис клітин можна здійснювати безпосередньо перед ферментацією. З цією метою все цукровмісне рідке середовище піддають лізису або знищенню. Це можна здійснювати термічним, механічним або хімічним способом.

Винахід стосується зокрема способу одержання органічних нелетких сполук, що містять щонайменше 3 атоми вуглецю або щонайменше 2 атоми вуглецю та щонайменше 1 атом азоту. При цьому під нелеткими органічними сполуками розуміють такі сполуки, які не можуть бути одержані дистиляцією із ферментаційного розчину у нерозкладеному вигляді. Температура кипіння цих сполук при нормальному тиску, як правило, вище температури кипіння води, часто вище 150°C та зокрема вище 200°C. Зазвичай при цьому йдеться про сполуки, які в нормальних умовах (298 K, 101,3 кПа) існують у твердому стані.

Однак можливо також використовувати цукровмісне рідке середовище в процесі ферментації для одержання нелетких продуктів метаболізму мікроорганізмів, температура плавлення яких при нормальному тиску нижче температури кипіння води та/або масляної речовини.

Поняття нелеткі продукти метаболізму мікроорганізмів включає зокрема органічні, моно-, ди- та трикарбонові кислоти, що містять переважно від 3 до 10 атомів вуглецю та, в разі потреби, 1 або кілька, наприклад, 1, 2, 3 або 4 гідроксильні групи, наприклад, винна, ітаконова, бурштинова, пропіонова, молочна, 3-гідроксипропіонова, фумарова, малеїнова, 2,5-фурандикарбонова, глутарова, левулінова, глюконова, акотинова та діамінопімелінова кислота, лимонна кислота; білкові та небілкові амінокислоти, наприклад, лізин, глутамат, метіонін, фенілаланін, аспарагінова кислота, триптофан та треонін; пуринова та піримідинова основи; нуклеозиди та нуклеотиди, наприклад, нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД) та аденозин-5'-монофосфат (АМФ); ліпіди; начисені та ненасичені жирні кислоти, що містять переважно від 10 до 22 атомів вуглецю, наприклад, γ -ліноленова, дигомо- γ -ліноленова, арахідонова, ейкозапентаєнова та докозагексаєнова кислота; діоли, що містять пе-

реваюно від 3 до 8 атомів вуглецю, наприклад, пропандіол та бутандіол; багатоатомні спирти, що містять 3 або більше, наприклад, 3, 4, 5 або 6 OH-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, гіалуронова кислота та трегалоза; ароматичні сполуки, наприклад, ароматичні аміни, ванілін та індіго; вітаміни та провітаміни, наприклад, аскорбінова кислота, вітамін B₆, вітамін B₁₂ 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; каротиноїди, наприклад, лікопін, β -каротин, атаксантин, зеаксантин та кантаксантин; кетони, що містять переважно від 3 до 10 атомів вуглецю та, в разі потреби, 1 або більше гідроксильних груп, наприклад, ацетон та ацетонін; лактони, наприклад, γ -бутиролактон, циклодекстрини, біополімери, наприклад, полігідроксиацетат, поліестери, наприклад, полілактид, полісахариди, поліізопреноїди, поліаміди; а також вихідні сполуки та похідні зазначених сполук. Інші сполуки, які можуть представляти собою нелеткі продукти метаболізму мікроорганізмів, описані під редакцією Gutcho в Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973), ISBN: 0818805086.

Поняття "кофактор" включає небілкові сполуки, які є необхідними для ініціювання нормальної ферментативної активності. Ці сполуки можуть бути органічними або неорганічними; молекули кофактора згідно з винаходом є переважно органічними. Прикладами таких молекул є НАД та 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 алкандіоли, 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 енантімерній формі (якщо у даному випадку можливі різні енантімери). Так, наприклад, із амінокислот, як правило, одержують відповідний L-енантімер.

Використовувані у ферментації мікроорганізми відомим чином класифікують за їх відповідними продуктами метаболізму, як зокрема зазначено нижче. Вони можуть бути природного походження

або генетично модифіковані. В таблиці А наведені приклади придатних мікроорганізмів та способів

ферментації.

Таблиця А:

Речовина	Мікроорганізм	Посилання
Винна кислота	<i>Lactobacilli</i> , (напр. <i>Lactobacillus delbrueckii</i>)	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 ma 1993-1995; Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973)
Ітаконова кислота	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus itaconicus</i>	Jakubowska, Smith u. Pateman (видавн.), <i>Genetics and Physiology of Aspergillus</i> , London: Academic Press 1977; Miall, in Rose (видавн.), <i>Economic Microbiology</i> , том 2, стор. 47-119, London: Academic Press 1978; US 3044941 (1962).
Бурштинова кислота	<i>Actinobacillus sp.</i> 130Z, <i>Anaerobiospirillum succiniproducens</i> , <i>Actinobacillus succinogenes</i> , <i>E. coli</i>	Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 498 -504 (1976); EP 249773 (1987), Erf.: Lemme u. Datta; US 5504004 (1996), Erf.: Guettler, Jain u. Soni; Arch. Microbiol. 167, 332 -342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., <i>Actinobacillus succinogenes sp. nov.</i> , a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan;49 Pt 1:207-16; US 5,723,322, US 5,573,931, US 5,521,075, WO 99/06532, US 5,869,301, US 5,770,435
Гідроксипропіонова кислота	<i>Lactobacillus delbrückii</i> , <i>L. leichmannii</i> або <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	RÖMPP Online Version 2.2
Пропіонова кислота	<i>Propionibacterium</i> , напр. <i>P. arabinosum</i> , <i>P. schermanii</i> , <i>P. freudenreichii</i> , <i>Clostridium</i>	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 ma 1993-1995; Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973),
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>	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331 -373 (1986); Food Bio-technol. 7, 221-234 (1993); 10, 13-27 (1996)
Аконітова кислота	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus wentii</i>	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331 -373 (1986); Food Biotechnol. 7, 221-234 (1993); 10, 13-27 (1996).; Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995
Яблучна кислота	<i>Aspergilli</i> , 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. delbrückii</i> , <i>L. leichmannii</i>	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995
Лізин	<i>Corynebacterium glu-tamicum</i>	Ikeda, M.: <i>Amino Acid Production Process</i> (2003), <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</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973)
Нікотинамідаденін-динуклеотид (НАД)	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973)
Аденозин-5'-монофосфат (АМФ)	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973)
γ-ліноленова кислота	<i>Mucor</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Aspergillus</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: <i>Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications</i> (1997). <i>Trends in Biotechnology</i> 15 (10), 401-409; Zhu, H.: <i>Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University</i> , 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855)
Дигомо-γ-ліноленова кислота	<i>Mortierella</i> , <i>Conidiobolus</i> , <i>Saprolegnia</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. Master Thesis Louisiana State University</i> , 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855)

Арахідонова кислота	<i>Mortierella, Phytium</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855)
Ейкозапентаєнова кислота	<i>Mortierella, Phytium</i> spp., <i>Rhodopseudomonas, Shewanella</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Докозагексаєнова кислота	<i>Thraustochytrium, Entomophthora</i> spp., <i>Rhodopseudomonas, Shewanella</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. 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.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 ma 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973); H. G. SCHLEGEL and H. W. JANNASCH, 1981; Afschar et al.: Mikrobielle Produktion von 2,3-Butandiol. CIT 64 (6), 2004, 570-571
Бутанол	<i>Clostridium</i> (напр. <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. propionicum</i>)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 ma 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Гліцерин	Дріжджі, <i>Saccharomyces rouxii</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Маніт	<i>Aspergillus candida</i> , <i>Torulopsis mannifaciens</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Арабіт	<i>Saccharomyces rouxii</i> , <i>S. mellis</i> , <i>Sclerotium glaucanicum</i> , <i>Pichia ohmen</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Ксиліт	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, 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</i> floriforme	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>	RÖMPP Online Version 2.2
Вітамін В ₁₂	<i>Propionibacterium</i> spp., <i>Pseudomonas denitrificans</i>	Chem. Ber. 1994, 923 -927; RÖMPP Online Version 2.2
Рибофлавін	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Ashbya gossypii</i>	WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664; Fujioka, K.: <i>New biotechnology for riboflavin (vitamin B₂) and character of this riboflavin</i> . <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> A. <i>oryzae</i>), <i>Trichoderma</i> , <i>E.coli</i> , <i>Hansenula</i> або <i>Pichia</i> (напр. <i>Pichia pastoris</i>), <i>Bacillus</i> (напр. <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>) і ін.	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 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., <i>Enhanced production of beta-carotene from Blakeslea trispora with Span 20</i> , <i>Bio-technology Letters</i> , Vol 19, No 6, 1997, 561-562; Mantouridou F., Roukas T.: <i>Effect of the aeration rate and agitation speed on beta-carotene production and morphology of Blakeslea trispora in a stirred tank reactor: mathematical modelling</i> , <i>Biochemical 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
Полігидроксиалканоати, поліестери	<i>Escherchia coli</i> , <i>Alcaligenes latus</i> і ін.	S. Y. Lee, <i>Plastic Bacteria Progress and Prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria</i> , <i>Tibtech</i> , Vo. 14, (1996), S. 431-438., Steinbüchel, 2003; Steinbüchel (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.	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973)
Поліізопреноїди	<i>Lactarius</i> sp., <i>Hygrophorus</i> sp., <i>Russula</i> sp.	Steinbüchel (Hg.), <i>Biopolymers</i> , 1 вид., 2003, Wiley-VCH, Weinheim та цитовані там літературні джерела
Ацетон	<i>Clostridium</i> (напр. <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. propionicum</i>)	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 та 1993-1995; Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973)
Ацетоїн	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Lengeier, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G.: Hrsg., <i>Biology of the Prokaryotes</i> , Thieme, Stuttgart (1999), S.307; RÖMPP Online-Edition
Ванілін	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Amycolatopsis</i> sp.	Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbüchel, A. <i>Biotechnological production of vanillin</i> . <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 56, 296-314 (2001)
Турингенсин	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Jian-Zhong Jong et al.: <i>Fed-batch culture of Bacillus thuringiensis for thuringensin production in a tower type bioreactor</i> . <i>Biotechnology and Bioengineering</i> 48 (3) (2004), 207-213
Полікетиди	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Sorangium cellulosum</i>	Kirst: <i>Fermentation-derived compounds as a source for new products</i> . <i>Pure & Appl. Chem.</i> 70 (2), (1998), 335-338; Zirkle et al.: <i>Heterologous production of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A of Sorangium cellulosum So ce26 in Streptomyces lividans</i> . <i>Microbiology</i> 150 (8), (2004), 2761-74
Гіберелінова кислота	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Hollmann et al.: <i>Extraktiv-Fermentation von Gibberellinsäure mit Gibberella fujikuroi</i> . <i>CIT</i> 7 (1995), 892-895
Індіго	<i>Escherichia coli</i> JB 102	Berry, A., Dodge, T.C., Pepsin, M., Weyler, W.: <i>Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo</i> . <i>Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology</i> 28 (2002), 127-133

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, протейногенних та непротейногенних амінокислот, пуринових основ, піримідинових основ, нуклеозидів, нуклеотидів, ліпідів; насичених та ненасичених жирних кислот; діолів, що містять від 4 до 10 атомів вуглецю, багатоатомних спиртів, що містять 3 або більше гідроксильних груп, довголанцюгових спиртів, що містять щонайменше 4 атоми вуглецю, вуглеводів, ароматичних сполук, вітамінів, провітамінів, кофакторів, нутріцевтичних засобів, 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 лизин, метіонін, треонін.

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

Ще одна переважна форма виконання винаходу стосується застосування одержаного згідно з винаходом рідкого середовища, що містить цукор, для ферментативного одержання таких сполук:

- моно-, ди- та трикарбонових кислот, зокрема аліфатичних моно- та дикарбонових кислот, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, таких як пропіонова, фумарова 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 виробленим в ході ферментації 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, довголанцюгові 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 глюканаз;

- амінокислоти, такі як лізин треонін або метионін;

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

- дисахариди, такі як трегалоза;

- аліфатичні моно- та дикарбонові кислоти, що містять від 3 до 10 атомів вуглецю, такі як пропіонова, фумарова 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 алкандіоли, до містять від 3 до 8 атомів вуглецю, такі як пропандіол.

Придатні мікроорганізми зазвичай вибирають з родів *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ashbya*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Rhizopus* та *Clostridium*, зокрема штамів *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*

oder *Alcaligenes latus*, *Anaerobiospirillum succiniproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus leichmannii*, *Propionibacterium arabinosum*, *Propionibacterium schermanii*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Rhizopus arrhizus* та *Rhizopus oryzae*.

У одній з переважних форм виконання винаходу під використовуваним у ферментації мікроорганізмом розуміють штам з роду *Propionibacterium*, зокрема штам *Corynebacterium glutamicum*. Переважно мова йде про штам з роду *Corynebacterium*, зокрема *Corynebacterium glutamicum*, який перевиробляє амінокислоту, а саме лізин, метионін або глутамат.

У іншій переважній формі виконання винаходу під використовуваним у ферментації мікроорганізмом розуміють штам з роду *Escherichia*, зокрема штам *Escherichia coli*. Переважно мова йде про штам з роду *Escherichia*, зокрема *Escherichia coli*, який перевиробляє амінокислоту, а саме лізин, метионін 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 метионін. Для здійснення ферментації можуть бути застосовані аналогічні умови та методи здійснення, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в WO 03/087386 та WO 03/100072.

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

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

Відповідно до ще однієї особливо переважної форми виконання винаходу під одержаним в ході ферментації продуктом метаболізму мікроорганізмів розуміють фумарову кислоту. Для здійснення ферментації можуть бути застосовані аналогічні умови та методи здійснення, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в Rhodes et al.,

Production of Fumaric Acid in 20-L Fermentors, *Applied Microbiology*, 1962, 10 (1), 9-15.

Відповідно до іншої особливо переважної форми виконання винаходу під одержаним в ході ферментації продуктом метаболізму мікроорганізмів розуміють бурштинову кислоту. Для здійснення ферментації можуть бути застосовані аналогічні умови та методи здійснення, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26, 498-504 (1976); EP 249773 (1987), винах.: Lemme u. Datta; US 5504004 (1996), винах.: Guettler, Jain u. Soni; *Arch. Microbiol.* 167, 332-342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Jan; 49 Pt 1:207-16; US 5,723,322, US 5,573,931, US 5,521,075, WO 99/06532, US 5,869,301 або US 5,770,435.

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

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

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

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

Збіднення або виділення продукту метаболізму із ферментаційного розчину, тобто органічної сполуки, що містить щонайменше 3 атоми вуглецю або щонайменше 2 атома вуглецю та щонайменше 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 мікроорганізмів 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-рідкій фазі, фахівцям відомі звичайні методи, які включають також стадії грубого та тонкого подрібнення цільових речовин, а також методи приготування (описані наприклад, в Belter, P. A, *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology*, John Wiley & Sons (1988), та Ullmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5. видан. на CD-ROM, Wiley-VCH).

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

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

Інша спеціальна форма виконання винаходу стосується способу, згідно з яким леткі компоненти ферментаційного розчину у значній кількості або повністю 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 2005042541.0) 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 видаляють до залишкової вологості не більше 30 мас. %, часто не більше 20 мас. % та зокрема не більше 15 мас. %. Зазвичай леткі компоненти ферментаційного розчину переважно видаляють із цього розчину до залишкової вологості від 0,2 до 30 мас. %, зокрема від 1 до 20 мас. %, особливо переважно від 2 до 15 мас. % та найбільш переважно від 5 до 15 мас. %, у перерахунку на визначену після сушки загальну вагу твердих компонентів. Залишкова вологість може бути визначена звичайними відомими фахівцям способами, наприклад, термогравіметричним аналізом (Hemminger et al., Methoden der thermischen Analyse, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989).

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

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

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

Відповідно до цієї форми виконання 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. %, напри-

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

До зазвичай використовуваних допоміжних речовин для одержання композиції належать, наприклад, зв'язувальні засоби, носії, засоби, що покращують припудрювання/текучість, а також фарбувальні пігменти, біоциди, диспергатори, знепінювачі, засоби, що регулюють в'язкість, кис-

лоти, луги, антиоксиданти, стабілізатори ферментів, інгібітори ферментів, адсорбати, жири, жирні кислоти, масла або їх суміші. Такі допоміжні речовини для одержання композиції переважно використовують при здійсненні способів приготування та сушки, наприклад, розпилювальної сушки, сушки у псевдозрідженому шарі та сублимаційної сушки, як допоміжні засоби для сушки. Інші деталі описані в РСТ/ЕР2006/066057 (пріоритетна заявка DE 10 2005042541.0).

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 1088 486, WO 98/55599, ЕР 0758018 та WO 92/12645.

В першому варіанті цієї форми виконання не-леткий продукт метаболізму мікроорганізмів, якщо він розчинений у рідкій фазі, переводять із рідкої фази у тверду, наприклад, кристалізацією або садженням. Потім здійснюють виділення нелетких твердих компонентів, включаючи продукт метаболізму, наприклад, центрифугуванням, декантуванням або фільтруванням. Подібним чином можна виділяти і масляні продукти метаболізму, причому відповідні масляні продукти ферментації переводять у тверду форму шляхом додавання адсорбентів, наприклад, кремнієвої кислоти, силікагелів, глини, крейди та активованого вугілля.

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

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

Здійснення ферментації може відбуватися також таким чином:

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

ii) цю частину, в разі потреби, після попереднього повного або часткового виділення твердих компонентів крохмалювмісної сировини, що не містять крохмаль, в разі потреби, разом з іншим джерелом цукру, як зазначено вище, 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 (ii) вміст твердої речовини у залишковій кількості рідкого середовища переважно становить максимум 50 мас. %, зокрема максимум 30 мас. %, особливо переважно максимум 10 мас. % та найбільш переважно максимум 5 мас. %. Зокрема у цьому випадку вигідно виділяти всі тверді речовини перед здійсненням ферментації для одержання другого продукту (В) метаболізму.

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

Переважаюча 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, використовуваний як добавка до кормів амінокислоту, наприклад, лізин, метіонін, треонін або глутамат, одержують при застосуванні ферментаційного розчину, що містить тверду речовину, а ідентичний другий продукт (В) метаболізму, наприклад, ту ж саму використовувану як харчова добавка амінокислоту, одержують при застосуванні ферментаційного розчину, збідненого твердими речовинами на стадії (ii). Завдяки такому повному або частковому виділенню твердих компонентів, що не містять крохмаль, можна зменшити витрати на очищення при обробці продукту метаболізму, сфера використання якого вимагає високої чистоти, наприклад, у випадку харчової добавки.

Відповідно до іншої переважної форми виконання цього способу можна, наприклад, діяти, як описано вище. При цьому здійснюють переважно масштабну ферментацію для одержання продуктів А метаболізму, наприклад, амінокислот, таких як лізин, метіонін, глутамат або треонін, лимонної кислоти або етанолу, наприклад, згідно з описаними в WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) або PCT/EP2006/066057 (пріоритетна заявка DE 10

2005042541.0) способами або відповідно до відомих з рівня техніки способів, описаних для ферментативного одержання біоетанолу. Відповідно до стадії (i) виділяють частину одержаного на стадії a2) рідкого середовища (1) або його суміші з іншим джерелом цукру. Виділену відповідно до стадії (i) частину на стадії (ii) можна повністю або частково очищувати від твердих речовин звичайними способами, наприклад, центрифугуванням або фільтруванням, залежно від вимог ферментації для одержання продукту В. Одержане таким чином, в разі потреби, повністю або частково звільнене від твердих речовин рідке середовище (1) відповідно до стадії (ii), в разі потреби, разом з іншим джерелом цукру, як зазначено вище, піддають ферментації для одержання продукту В метаболізму. Виділений на стадії (ii) потік твердих речовин переважно повторно використовують у потоці цукорвмісного рідкого середовища при здійсненні ферментації у великих масштабах.

Якщо одержаним в ході ферментації у великих масштабах продуктом (А) метаболізму мікроорганізмів є етанол, то здійснюють виділення із рідкого середовища (1). При цьому рідке середовище (1) повинно містити таку кількість цукру, яку зазвичай використовують при ферментативному одержанні етанолу (біоетанолу), наприклад, від 20 до 30 мас. %. Зазвичай у цій формі виконання одержану на стадії (i) залишкову кількість цукорвмісного рідкого середовища (1) піддають ферментації для одержання продукту А (тобто в даному випадку етанолу). Разом з іншим джерелом цукру виділену на стадії (i) часткову кількість цукорвмісного рідкого середовища (1), в разі потреби, після виділення твердих речовин відповідно до стадії (ii) піддають ферментативному одержанню продукту В.

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

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

повторно використовують у потоці цукорвмісного рідкого середовища при здійсненні ферментації у великих масштабах.

Одержаний таким чином на стадії (ii) ферментаційний розчин, що містить рибофлавін, можна піддавати подальшій обробці в аналогічних умовах та аналогічними методами, що були описані для інших джерел вуглецю, наприклад, в DE 4037441, EP 464582, EP 438767 та DE 3819745. Після лізису клітинної маси відбувається виділення кристалічного рибофлавіну переважно декантуванням. Крім того можливими є також і інші методи виділення твердої речовини, наприклад, фільтрування. Після цього рибофлавін сушать, переважно за допомогою розпилювальною сушарки або сушарки з псевдозрідженням шаром. Альтернативно одержану на стадії (ii) ферментаційну суміш, що містить рибофлавін, можна піддавати подальшій обробці в аналогічних умовах та аналогічними методами, що були описані, наприклад, в EP 1048668 та EP 730034. Після пастеризації ферментаційний розчин центрифугують, а залишкові фракції, що 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. Цукорвмісне рідке середовище (1), попередньо очищене, переважно в основному звільнене від твердих речовин відповідно до стадії (ii), або його суміш з іншим джерелом цукру піддають ферментації відповідно до стадії (ii) для одержання пантотенової кислоти. При цьому особливо вигідним є зменшення в'язкості порівняно із рідким середовищем, що містить тверду речовину.

Виділений потік твердої речовини переважно повторно використовують у потоці цукорвмісного рідкого середовища при здійсненні ферментації у великих масштабах.

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

Виділені тверді речовини можуть бути одержані в рамках паралельно здійснюваного у великих масштабах способу ферментації разом із відповідним бажаним продуктом метаболізму (A) 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. Без додавання фітази на стадії оцукрювання

II.1a) Ферментативне розрідження крохмалю

Із 320 г сухої подрібненої кукурудзяної муки (T71/03) при постійному перемішуванні готують суспензію 480 г води та додають 310 мг хлориду кальцію. Перемішування продовжують протягом

всього процесу. Після встановлення значення pH=6,5 за допомогою H₂SO₄ та нагрівання до 35°C додають 2,4 г термамілу 120L типу L (фірми Novozymes A/S). Через 40 хвилин реакційну суміш нагрівають до температури 86,5°C, при цьому значення pH, в разі потреби, доводять до попередньо встановленого значення за допомогою NaOH. Протягом 30 хвилин додають наступні 400 г сухої подрібненої кукурудзяної муки (T71/03), причому

температуру підвищують до 91°C. Реакційну суміш тримають при такій температурі протягом приблизно 100 хвилин. Потім додають інші 2,4 г термамилу 120L та температуру тримають протягом приблизно 100 хвилин. Хід процесу розрідження контролюють протягом усього дослідження реакцією крохмалю на йод. Після цього температуру підвищують до 100°C та реакційну суміш наступні 20 хвилин кип'ятять. На цей момент часу крохмаль більше не виявляють. Реактор охолоджують до 35°C.

II.1b) Оцукрювання

Одержану на стадії II.1a) реакційну суміш при постійному перемішуванні нагрівають до 61°C. Перемішування продовжують протягом всього процесу. Після встановлення значення pH=4,3 за допомогою H₂SO₄ додають 10,8 г (9,15 мл) Dextrozyme GA (фірми Novozymes A/S). Температуру тримають протягом приблизно 3 годин, причому хід реакції контролюють за допомогою паличок для виявлення глюкози (S-глюкотест фірми Boehringer). Результати наведені нижче в таблиці II. Потім реакційну суміш нагрівають до 80°C та після цього охолоджують. Одержують приблизно 1180 г рідкого продукту, густина якого становить приблизно 1,2 кг/л, а визначений за допомогою інфрачервоної сушарки вміст сухої маси становить приблизно 53,7 мас. %. Вміст сухої маси (без розчинних у воді компонентів) після промивання водою становить приблизно 14 мас. %. Визначений ВЕРХ вміст глюкози у реакційній суміші становить 380 г/л (див. табл. 2, зразок № 7).

Таблиця II

Зразок №	хв. (від додавання глюкоамілази)	конц. глюкоза у надлишку [г/л]
1	5	135
2	45	303
3	115	331
4	135	334
5	165	340
6	195	359
7	225	380

II.2. 3 додаванням фітази на стадії оцукрювання

II.2a) Розрідження крохмалю

Сухо подрібнений зразок кукурудзяної муки розріджують відповідно до II.1a).

II.2b) Оцукрювання

Одержану на стадії II.2a) реакційну суміш при постійному перемішуванні нагрівають до 61°C. Перемішування продовжують протягом всього процесу. Після встановлення значення pH=4,3 за допомогою H₂SO₄ додають 10,8 г (9,15 мл) Dextrozyme GA (фірми Novozymes A/S) та 70 мкл фітази (700 одиниць фітази, Natuphyt Liquid 10000L фірми BASF Aktiengesellschaft). Температуру тримають протягом приблизно 3 годин, причому хід реакції контролюють за допомогою паличок для виявлення глюкози (S-глюкотест фірми Boehringer). Потім реакційну суміш нагрівають до 80°C та після цього охолоджують. Одержаний

продукт сушать за допомогою інфрачервоної сушарки та промивають водою. Вміст глюкози у реакційній суміші визначають ВЕРХ.

II.3 Інші методики для ферментативного розрідження та оцукрювання крохмалю

II.3a) Кукурудзяна мука

360 г деіонізованої води поміщають у реакційну посудину. Додають 1,54 мг концентрованого розчину CaCl₂ (100 г CaCl₂·xH₂O/л) до досягнення кінцевої концентрації приблизно 70 м.ч. Ca²⁺ у суміші. При постійному перемішуванні у воду повільно засипають 240 г кукурудзяної муки. Після встановлення значення pH=6,5 за допомогою 50 мас. %-ного водного розчину NaOH додають 4,0 мл (=2 мас. % суміші фермент/суха маса) термамил 120 L типу L (фірми Novozymes A/S). Потім суміш швидко нагрівають до 85°C. При цьому необхідно постійно контролювати значення pH та, в разі потреби, доводити до необхідного значення.

Після досягнення кінцевої температури розпочинають додавання іншої кількості муки, спочатку 50 г муки. Додатково у суміш додають 0,13 мл концентрованого розчину CaCl₂ для підтримання концентрації Ca²⁺ біля позначки 70 м.ч.. В ході додавання температуру постійно підтримують при 85°C. Чекають щонайменше 10 хвилин для забезпечення повної реакції перед додаванням іншої порції (50 г муки та 0,13 мл концентрованого розчину CaCl₂). Після додавання двох порцій додають 1,67 мл термамилу; потім додають дві інші порції (відповідно 50 г муки та 0,13 мл концентрованого розчину CaCl₂). Вміст сухої маси досягає 55 мас. %. Після додавання температуру підвищують до 100°C та суміш кип'ятять протягом 10 хвилин.

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

Суміш, результати дослідження на крохмаль якої є негативними, для здійснення реакції оцукрювання нагрівають до 61°C. Шляхом додавання 50%-ної сірчаної кислоти встановлюють значення pH=4,3. В ході реакції значення pH тримають біля цієї позначки. Температуру тримають біля позначки 61°C. Додають 5,74 мл (=1,5 мас. % суміші фермент/суха маса) Dextrozym GA (фірми Novozymes A/S) з метою перетворення розрідженого крохмалю на глюкозу. Реакцію продовжують протягом однієї години. Для дезактивації ферменту суміш нагрівають до 85°C. Гарячу суміш поміщають у стерильний резервуар та зберігають там після охолодження при 4°C. Одержують кінцеву концентрацію глюкози 420 г/л.

II.3b) Житня мука (включаючи попередню обробку целюлазою/геміцелюлозою)

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

Додають 1,7 мл концентрованого розчину CaCl_2 (100 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /л). Після встановлення значення pH=6,5 за допомогою 50 мас. %-ного водного розчину NaOH додають 5,0 мл (=2 мас. % суміші фермент/суха маса) термамилу 120 L типу L (фірми Novozymes A/S). Потім суміш швидко нагрівають до 85°C. При цьому постійно контролюють значення pH та, в разі потреби, доводять його до необхідного значення.

Після досягнення кінцевої температури розпочинають додавання іншої кількості муки, спочатку 60 г муки. Додатково у суміш додають 0,13 мл концентрованого розчину CaCl_2 для підтримання концентрації Ca^{2+} біля позначки 70 м.ч.. В ході додавання температуру постійно підтримують при 85°C. Чекають щонайменше 10 хвилин для забезпечення повної реакції перед додаванням іншої порції (40 г муки та 0,1 мл концентрованого розчину CaCl_2). Додають 1,1 мл термамилу; потім додають ще одну порцію (40 г муки та 0,1 мл концентрованого розчину CaCl_2). Вміст сухої маси досягає 55 мас. %. Після додавання температуру підвищують до 100°C та суміш кип'ятять протягом 10 хвилин.

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

Суміш, результати дослідження на крохмаль якої є негативними, для здійснення оцукрювання нагрівають до 61°C. Шляхом додавання 50%-ної сірчаної кислоти встановлюють значення pH=4,3. В ході реакції значення pH тримають біля цієї позначки. Температуру тримають біля 61°C. Додають 5,74 мл (=1,5 мас. % суміші фермент/суха маса) Dextrozum GA (фірми Novozymes A/S) з метою перетворення розрідженого крохмалю на глюкозу. Реакцію продовжують протягом 1 години. Для дезактивації ферменту суміш нагрівають до 85°C. Гарячу суміш поміщають у стерильний резервуар та зберігають там після охолодження при 4°C. Одержують кінцеву концентрацію глюкози 370 г/л.

II.3с) Пшенична мука (включаючи попередню обробку ксиланазою)

360 г деіонізованої води поміщають у реакційну посудину. Воду нагрівають до 55°C та за допомогою 50 мас. %-ного водного розчину NaOH встановлюють значення pH=6,0. Після встановлення температури та значення pH додають 3,21 мл (=2,5 мас. % суміші фермент/суха маса) Shearzyme 500L (фірми Novozymes A/S). При постійному перемішуванні у розчин повільно засипають 155 г пшеничної муки. Тримають постійне значення температури та значення pH. Через 30 хвилин розпочинають додавання додаткової кількості муки, спочатку додають 55 г муки. Через наступні 30 хвилин додають ще 50 г муки; ще через 30 хвилин ще раз додають 40 г муки. Через 30 хвилин після останнього додавання можна розпочинати розрідження.

Розрідження та оцукрювання здійснюють, як описано у пункті II.3б. Одержують кінцеву концентрацію глюкози 400 г/л.

III. Штам ATCC13032 *lysC^{fb}r*

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

Приклад 1

Одержують відповідно гідролізат кукурудзяної, пшеничної та житньої муки, як описано нижче у пункті 1). Загальний вміст цукру у кожному з цих середовищ підвищують шляхом додавання різних розчинів цукру (що містять глюкозу, цукор-сирець, меласу). Середовища застосовують у дослідженнях в хитних колбах при використанні *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032 *lysC^{fb}r*) та *Bacillus PA824* (точний опис наведений у WO 02/061108) як джерела вуглецю.

1) Одержання гідролізату муки

а) Гідролізат кукурудзяної муки

360 г деіонізованої води поміщають у реакційну посудину. При постійному перемішуванні у воду повільно засипають 155 г кукурудзяної муки.

- Розрідження

Після встановлення значення pH=5,8 за допомогою 50 мас. %-ного водного розчину NaOH додають 2,6 мл (=2 мас. % суміші фермент/суха маса) Liqueozyme SC (фірми Novozymes A/S).

Потім суміш швидко нагрівають до 100°C та кип'ятять протягом 10 хвилин. При цьому постійно контролюють значення pH та, в разі потреби, доводять до необхідного значення.

Беруть пробу та охолоджують її до кімнатної температури. Після розрідження проби деіонізованою водою (приблизно 1:10) додають краплю концентрованого розчину Люголя (суміш 5 г йоду та 10 г йодиду калію на літр). При цьому темно-синє забарвлення свідчить про вміст залишкового крохмалю; проба зафарбовується у коричневий колір, коли крохмаль повністю гідролізований.

- Оцукрювання

Суміш, результати дослідження на крохмаль якої є негативними, для здійснення реакції оцукрювання нагрівають до 61°C. Шляхом додавання 50%-ної сірчаної кислоти встановлюють значення pH=4,3. В ході реакції значення pH тримають біля цієї позначки. Температуру тримають біля позначки 61°C. Додають 2,0 мл (=1,5 мас. % суміші фер-

мент/суха маса) Dextrozym GA (фірми Novozymes A/S) з метою перетворення розрідженого крохмалю на глюкозу. Реакцію продовжують протягом однієї години. Для дезактивації ферменту суміш нагрівають до 85°C. Гарячу суміш поміщають у стерильний резервуар та зберігають там після охолодження при 4°C.

б) Гідролізат пшеничної муки

- Попередня обробка ксиланазою

360 г деіонізованої води поміщають у реакційну посудину. Воду нагрівають до 55°C та за допомогою 50 мас. %-ного водного розчину NaOH встановлюють значення pH=6,0. Після встановлення температури та значення pH додають 3,21 мл (=2,5 мас. % суміші фермент/суха маса) Shearzyme 500L (фірми Novozymes A/S). При постійному перемішуванні у розчин повільно засипають 155 г пшеничної муки. Тримують постійне значення температури та значення pH. Через 30 хвилин можна розпочинати розрідження.

Розрідження та оцукрювання здійснюють, як описано у пункті 1а).

С) Гідролізат житньої муки

- Попередня обробка целюлазою/геміцелюлазою

360 г деіонізованої води поміщають у реакційну посудину. При постійному перемішуванні повільно засипають 155 г житньої муки у воду. Температуру постійно тримають біля позначки 50°C. Після встановлення значення pH=5,5 за допомогою 50%-ної сірчаної кислоти додають 3,21 мл (=2,5 мас. % суміші фермент/суха маса) Viscozyme L (фірми Novozymes A/S). Через 30 хвилин можна розпочинати розрідження.

Розрідження та оцукрювання здійснюють, як описано у пункті 1а).

2) Одержання затравки

а) для *Corynebacterium glutamicum*

Клітини після нанесення на стерильний CM+CaAc-агар (склад: див. таблицю 1; 20 хвилин при 121°C) протягом ночі інкубують при 30°C. Потім клітини зіскоблюють з планшет та суспендують у соляному розчині. 25 мл середовища (див. таблицю 4) поміщають в 250 мл колбу Ерленмейера з двома дефлекторами та як затравку додають відповідно таку кількість одержаної таким чином суспензії клітин, щоб оптична густина 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

б) для *Bacillus*

42 мл попереднього живильного середовища (див. таблицю 2) поміщають у 250 мл колбу Ерленмейера з двома дефлекторами та затрують відповідно 0,4 мл замороженої культури і протягом 24 годин при 43°C при струшуванні (250 хв⁻¹) інкубують у зволоженій хитній шафі.

Таблиця 2

Склад попереднього живильного середовища

Компонент	Концентрація
мальтоза	28,6 г/л
соева мука	19,0 г/л
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,6 г/л
глутамат мононатрію	4,8 г/л
цитрат натрію	0,95 г/л
FeSO ₄ ·xH ₂ O	9,5 мг/л
MnCl ₂ ·xH ₂ O	1,9 мг/л
ZnSO ₄ ·xH ₂ O	1,4 мг/л
CoCl ₂ ·xH ₂ O	1,9 мг/л
CuSO ₄ ·xH ₂ O	0,2 мг/л
Na ₂ MoO ₄ ·xH ₂ O	0,7 мг/л
K ₂ HPO ₄ ·xH ₂ O	15,2 г/л
KH ₂ PO ₄	3,9 г/л
MgCl ₂ ·xH ₂ O	0,9 г/л
CaCl ₂ ·xH ₂ O	0,09 г/л
MOPS	59,8 г/л
pH*	7,2

* визначають за допомогою розрідженого водного розчину KOH

42 мл основного живильного середовища (див. таблицю 6) поміщають у 250 мл колбу Ерленмейера з двома дефлекторами та затрують відповідно 1 мл вихідної культури.

3) Одержання ферментаційного розчину

а) для *Corynebacterium glutamicum*

Склад середовища у колбі наведений в таблиці 4. Початкова концентрація цукру повинна становити 60 г/л. При цьому одна половина цукру походить із гідролізату (ферментаційного середовища (1)), а іншу половину додають як розчин цукру. З цією метою одержують суміш гідролізату і розчину цукру та додають у середовище колби. У контрольному середовищі використовують відповідну кількість розчину глюкози.

- Одержання гідролізату муки з додаванням цукру

Готують такі розчини (див. таблицю 3):

Таблиця 3

Приготування гідролізатів муки з додаванням цукру

Гідролізат муки	Концентрація глюкози у гідролізаті [г/л]	Гідролізат на літр суміші [мл]	Розчин цукру	Концентрація у розчині цукру [г/л]	Розчин цукру на літр суміші [мл]
Кукурудза 30%	250,0	240	глюкоза	626	96
Кукурудза 30%	250,0	240	цукор-сирець	639	94
Пшениця 30%	258,9	232	глюкоза	626	96
Пшениця 30%	258,9	232	цукор-сирець	639	94
Жито 30%	217,9	275	глюкоза	626	96
Жито 30%	217,9	275	цукор-сирець		94

Таблиця 4

Середовище у колбі

Гідролізат муки з розчином цукру	500 мл/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
лимонна кислота x 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 x7H ₂ O	0,3 г/л
FeSO ₄ x7H ₂ O	25 мг/л
MnSO ₄ x4-6H ₂ O	5 мг/л
ZnCl ₂	10 мг/л
CaCl ₂	20 мг/л
H ₃ BO ₃	150 мкг/л
CoCl ₂ x6H ₂ O	100 мкг/л
CuCl ₂ x2H ₂ O	100 мкг/л
NiSO ₄ x6H ₂ O	100 мкг/л
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	25 мкг/л
біотин (віт. Н)	1050 мкг/л
тіамін x HCl (віт. В ₁)	2100 мкг/л

нікотинамід	2,5 мг/л
пантотенова кислота	125 мг/л
ціанокобаламін (віт. В ₁₂)	1 мкг/л
4-амінобензойна кислота (PABA; віт. Н ₁)	600 мкг/л
фолієва кислота	1,1 мкг/л
піридоксин (віт. В ₆)	30 мкг/л
рибофлавін (віт. В ₂)	90 мкг/л
CSL	40 мл/л
pH*	6,85

* значення встановлене з використанням розрідженого водного розчину NaOH

Після введення затравки колби протягом 3 днів інкубують при 30°C при струшуванні (200 хв⁻¹) у зволоженій хитній шафі. Після завершення ферментації визначають вміст лізину за допомогою ВЕРХ. Аналізи ВЕРХ здійснюють на РХ компанії Agilent серії 1100. Концентрацію амінокислот визначають ВЕРХ Agilent серії 1100. Передколонкова дериватизація орто-фталевим альдегідом дозволяє кількісно визначати утворені амінокислоти, розділення суміші амінокислот здійснюють на колонці Hypersil AA (Agilent). Результати наведені нижче в таблиці 5.

Таблиця 5

Середні показники

Гідролізат муки	Розчин цукру	Лізин [г/л]	Вихід*
Кукурудза	глюкоза	12,50	0,21
	цукор-сирець	10,64	0,19
	меласа	10,06	0,18
Пшениця	глюкоза	10,82	0,18
	цукор-сирець	10,14	0,18
	меласа	9,67	0,17
Жито	глюкоза	10,89	0,18
	цукор-сирець	9,59	0,16
	меласа	9,67	0,16
Контрольна група		11,54	0,20

* у перерахунку на всі еквіваленти глюкози

б) для *Bacillus*

Склад середовища у колбі наведений в таблиці 6. Початкова концентрація глюкози повинна становити 28,6 г/л. При цьому одна половина цукру походить із гідролізату, а іншу половину додають як розчин глюкози. У контрольному середовищі використовують відповідну кількість розчину глюкози.

Таблиця 6

Середовище у колбі

кукурудза 250 г/л †	57 мл/л ‡		
пшениця 259 г/л †		55 мл/л ‡	
жито 218 г/л †			67 мл/л ‡
розчин глюкози (с=626 г/л)	23 мл/л		
соєва мука	19,0 г/л		
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,6 г/л		
глутамат мононатрію	4,8 г/л		
цитрат натрію	0,95 г/л		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	9,5 мг/л		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,9 мг/л		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,4 мг/л		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,9 мг/л		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2 мг/л		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,7 мг/л		
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	15,2 г/л		
KH ₂ PO ₄	3,9 г/л		
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,9 г/л		

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,09 г/л
MOPS	59,8 г/л
pH*	7,2

* визначають за допомогою розрідженого водного розчину NaOH

† концентрація глюкози в гідролізаті

‡ необхідна наважка гідролізату на літр середовища

Після введення затравки колби протягом 24 годин інкубують при 43°C при струшуванні (200 хв⁻¹) у зволоженій хитній шафі. Після завершення ферментації визначають вміст глюкози та пантотенової кислоти за допомогою ВЕРХ. Глюкозу визначають за допомогою колонки Aminex HPLC-87H фірми Bio-Rad. Концентрацію пантотенової кислоти визначають розділенням на колонці Aqua C18 (фірми Phenomenex).

Результати наведені нижче в таблиці 7.

Таблиця 7

Середні показники через 24 години

	Пантотенова кислота, t=24 год. [г/л]	Вихід [г пантотен. кислоти / г глюкози]
Кукурудза	2,7	0,09
Пшениця	2,4	0,08
Жито	2,7	0,09
Контр. група	2,7	0,09