



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111473** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)**C12N 9/24** (2006.01)**C12N 9/42** (2006.01)**C12P 1/02** (2006.01)**C12P 7/10** (2006.01)**C12P 19/00****C12R 1/885** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2013 01641	(72) Винахідник(и): Бен Шаабан Фадель (FR), Моно Фредерік (FR)
(22) Дата подання заявки: 16.06.2011	(73) Власник(и): ІФП ЕНЕРЖИ НУВЕЛЛЬ, Direction Propriete Industrielle, 1 & 4 avenue de Bois Preau, F-92852 Rueil Malmaison Cedex, France (FR)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.05.2016	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 1002923	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Chauve M. et al., Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases // <i>Biotechnology for biofuels</i> . – 2010. – Vol. 3, – № 1, – P. 3-10. EP 1 690 944 A1, 16.08.2006. Ling M. et al., Induction of cellulase gene transcription by a novel oligosaccharide: molasses alcohol still age substance // <i>World journal of microbiology & biotechnology</i> . – 2009. – Vol. 25, – №8, – P. 1485-1489. Herpoël-Gimbert I. et al., Comparative secretome analyses of two <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains // <i>Biotechnology for biofuels</i> . – 2008. – Vol.1, – №1, – P. 18-29. Pourquié J et al., Scale up of cellulase production and utilization // <i>Biochemistry and genetics of cellulose degradation</i> . – 1988, – P. 71 – 86. Pourquié J et al., Cellulase production by <i>Trichoderma reesei</i> // <i>Bioconversion of forest and agricultural plant residues</i> . - 1993. - P.107-116.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 12.07.2010	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: FR	
(41) Публікація відомостей про заявку: 27.05.2013, Бюл.№ 10	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.05.2016, Бюл.№ 9	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/FR2011/000350, 16.06.2011	

(54) ПОЛІПШЕНИЙ СПОСІБ ОТРИМАННЯ ФЕРМЕНТІВ ЦЕЛЮЛАЗИ І/АБО ГЕМІЦЕЛЮЛАЗИ**(57) Реферат:**

Спосіб одержання ферментів целюлази і/або геміцелюлази *Trichoderma reesei*, при зниженому вмісті лактози, що включає щонайменше одну стадію зростання в присутності вуглецевого джерела і щонайменше одну стадію продукування в присутності індукуючого субстрату, де

UA 111473 C2

індукуючим субстратом є суміш, що містить від 40 до 65 % мас. глюкози або целюлозних гідролізатів, від 21 до 25 % мас. лактози та від 10 до 39 % мас. ксилози або розчину геміцелюлозного лігноцелюлозного гідролізату, причому сума цих трьох компонентів дорівнює 100 %.

Галузь, до якої належить винахід

Винахід стосується способу продукування ферментів для гідролізу лігноцелюлозної біомаси. Рівень техніки

Збільшення виробництва біоетанолу, що володіє якість біопалива, є в цей час актуальним. Цілі впровадження обговорюються в цей час в Європейському Союзі, основуючись на первинній пропозиції використати 20% джерел енергії, що відновляються до 2020 року при впровадженні 10% біопалива відповідно до критеріїв довготривалого використання, які повинні сприяти використанню біопалива другого покоління, що отримується з лігноцелюлозної біомаси.

Лігноцелюлозна біомаса характеризується складною структурою, що складається з трьох основних полімерів: целюлози, геміцелюлози і лігніну.

Традиційно спосіб перетворення біомаси в етанол складається з декількох стадій. Попередня обробка забезпечує доступність целюлози і можливо геміцелюлоз, які є мішенями ферментативного гідролізу, для ферментів. Метою попередньої обробки є зміна фізичних і фізико-хімічних властивостей лігноцелюлозного матеріалу для поліпшення доступності целюлози, укладеної в матриці з лігніну і геміцелюлози. Стадія ферментативного гідролізу забезпечує перетворення целюлози і геміцелюлоз в цукри шляхом використання целюлолітичних і/або геміцелюлолітичних ферментів.

Цукри, отримані гідролізом лігноцелюлозної біомаси, являють собою пентози (головним чином, ксилозу і арабінозу), дисахариди (целобіозу) і глюкозу, які можуть ферментувати мікроорганізмами. Глюкоза, наприклад, може легко перетворюватися в етанол за допомогою дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* на стадії спиртової ферментації.

Нарешті, стадія дистиляції дозволяє відділяти і витягувати продукт, отриманий внаслідок ферментації, тобто етанол в попередньому випадку, з ферментованого сусла.

Різні техніко-економічні дослідження показують необхідність зниження вартості на стадії ферментативного гідролізу з тим, щоб довести вартість отриманого етанолу до величин, близьких до вартості етанолу, що отримується з крохмалю.

У цей час промислові целюлази отримують головним чином з філаментозного гриба *Trichoderma reesei* в зв'язку з його високою здатністю секретувати целюлази.

Один із засобів зменшення вартості полягає в оптимізації умов здійснення способу отримання целюлаз шляхом підвищення продуктивності або шляхом отримання ферментного коктейлю, що володіє поліпшеною специфічною активністю.

Дикі штами *Trichoderma reesei* володіють здатністю секретувати в присутності субстрату-індуктора ферментний комплекс, добре адаптований до гідролізу целюлози. Ферменти ферментного комплексу володіють трьома типами активності: ендоглюканаз, екзоглюканаз і целобіаз. Інші білки, такі як ксиланаз, необхідні для гідролізу лігноцелюлозної біомаси, також продукуються *Trichoderma reesei*. Присутність субстрату-індуктора необхідна для експресії целюлолітичних і/або геміцелюлолітичних ферментів.

Регуляція генів целюлази на різних вуглецевих джерелах детально досліджувалася. Глюкоза надає катаболічну репресію на продукування целюлаз. Вона індукується в присутності целюлози, продуктів її гідролізу, таких як целобіоза, або деяких олігосахаридів, зокрема, дисахаридів, таких як лактоза або софороза (Ilmen et al. 1997, Appl. Environ. Microbiol. Vol 63 p. 1298-1306). Природа вуглецевого субстрату має великий вплив на склад ферментного комплексу. Так, ксилоза в поєднанні з індукуючим вуглецевим субстратом, таким як целюлоза або лактоза, дозволяє істотно поліпшувати активність, яка називається ксиланазною, якщо вона присутня в обмежених концентраціях порядку від 0,5 до 1 мкМ (Mach-Aigner et al., 2010 Applied and Environmental Microbiology, Vol 76 N6, стор. 1770-1776). Розчинення залишкових геміцелюлоз (ксиланів) ксиланазми сприяє ферментативному гідролізу (Varnai et al., 2010 Enzyme and Microbial Technology Vol 46, стор. 185-193).

Для досягнення високої продуктивності ферментів необхідно внести швидко асимільоване джерело вуглецю для забезпечення швидкого росту *Trichoderma reesei* і індукуючий субстрат, який забезпечує експресію целюлаз і секрецію в культурному середовищі. Целюлоза може виконувати обидві ці ролі. Однак її важко використати на промисловій стадії і її замінюють розчинними вуглецевими джерелами, такими як лактоза, що є також індукуючим субстратом.

Інші джерела, такі як целобіоза або софороза, також описані як індуктори (Ilmen et al. (1997), Foreman et al., (2003) Biol Chem 278, стор. 31988-31997, Pakula et al., (2005) Microbiology, 151, стор. 135-143), але є такими, що дуже дорого коштують для використання в промисловості.

Головним чином було зазначено, що продукування целюлаз *Trichoderma reesei* з використанням розчинних субстратів значно менше, ніж продукування целюлаз в режимі "batch" за рахунок ефекту репресії цукрів, що легко асимілюються у високій концентрації.

У патенті FR-B-2555603, поданому на ім'я заявника, пропонується безперервна подача вуглецевих субстратів, що дозволяє підвищити катаболічну репресію шляхом обмеження залишкової концентрації в культурах і оптимізації кількостей цукрів для отримання кращого виходу і кращої ферментної продуктивності. У способі, описаному в цьому патенті,

пропонується почати подачу субстрату з використанням розчинних цукрів, таких як вуглецеве джерело, можливо в формі суміші. Однак обмежуюче безперервне введення глюкози або ксилози, не асоційоване з лактозою або іншим індуктором целюлаз (софороза, целобіоза,...) не дозволяє отримувати високу продуктивність ферментів.

У промислових способах отримання целюлолітичних ферментів лактоза залишається одним з найбільш придатних субстратів. Її ціна є високою і крім того дуже коливається і складає приблизно третину собівартості ферментів.

Одне з рішень, що пропонуються, представлене в патенті EP-B-0448430, полягає у використанні вуглецевих субстратів, що виходять з філь'єри, наприклад, гідролізованих геміцелюлоз як індукуючого джерела вуглецю. Однак продуктивність залишається нижче

приблизно на 50% по відношенню до способу, в якому використовують тільки лактозу як індукуючий субстрат.

У заявці на патент WO 2009/026716 описаний спосіб продукування целюлаз, в якому геміцелюлолітичні похідні складають більше 40% вуглецевого джерела і цукри, що індукують отримання целюлаз, складають від 3 до 20% цієї суміші. Цей спосіб дозволяє отримувати щонайменше в два рази більше целюлаз в порівнянні зі способом, в якому використовується тільки цукор, отриманий з геміцелюлоз. Однак описані робочі характеристики продукування целюлаз залишаються більш низькими в порівнянні зі способом, в якому використовують тільки лактозу.

Сучасні дослідження показують, що для удосконалення способів продукування целюлолітичних і/або геміцелюлолітичних ферментів необхідно розробляти нові індукуючі субстрати, щонайменше, такі ж ефективні, як і ті, в яких використовують лактозу, і з меншою вартістю.

Даний винахід вписується в ці рамки.

Короткий виклад суті винаходу

Даний винахід стосується способу продукування целюлолітичних і/або геміцелюлолітичних ферментів, в якому індукуючий субстрат є сумішшю глюкози, лактози і ксилози.

Докладний опис винаходу

Спосіб продукування целюлолітичних і/або геміцелюлолітичних ферментів целюлолітичним і/або геміцелюлолітичним мікроорганізмом за даним винаходом включає щонайменше одну стадію росту в присутності вуглецевого джерела і щонайменше одну стадію продукування в присутності індукуючого субстрату, в якій вказаний індукуючий субстрат являє собою суміш глюкози або целюлозних гідролізатів, лактози і ксилози або розчину геміцелюлолітичних гідролізатів, причому вміст кожного з компонентів суміші визначений в наступних межах:

- від 40 до 65% мас. глюкози або целюлозних гідролізатів,

- від 21 до 25% мас. лактози і

- від 10 до 39% мас. ксилози або розчину геміцелюлозних гідролізатів, причому сума цих трьох компонентів дорівнює 100%.

Індукуючий субстрат не містить ніякого іншого цукру крім перерахованих вище компонентів. Таким чином, відносні кількості кожного з компонентів вибирають так, що сума показників вагових вмістів дорівнює 100%.

Завдяки способу за винаходом, в якому використовують суміш певних цукрів як індукуючий субстрат, отримані кінцеві концентрації білків на 50-60% більше, ніж концентрації, отримані з використанням лактози як єдиного індукуючого субстрату. Вони приблизно в 3 рази перевищують концентрацію, отриману з використанням поліпшених сумішей, багатих ксилозами, таких як описані в WO 2009/026716 з рівня техніки.

У способі за даним винаходом використовують суміш на основі глюкози. Більше 60% лактози, що індукуює отримання целюлази, можна замінити глюкозою, що відома як репресуюча продукування целюлаз з поліпшеною кінцевою робочою характеристикою індукуючої суміші. Глюкоза має істотно меншу вартість, ніж лактоза і приблизно в 3 рази більшу розчинність у воді. Можна таким чином зменшити використовувані об'єми. Таким чином, в цьому способі глюкозу використовують одночасно на стадії росту, а також на стадії продукування на рівні 60% в складі суміші, що є індукуючим субстратом.

Глюкозу, що використовується в суміші цукрів, можна також замінювати глюкозою, отриманою на стадії ензиматичного гідролізу целюлози, тобто безпосередньо способом перетворення лігноцелюлозної біомаси в етанол. Це сприяє зниженню вартості отриманні

ферментів шляхом використання співпродуктів способу. У цьому випадку мова йде про целюлозні гідролізати.

Ксилозу, що використовується в суміші, що є індукуючим цукром, можна замінити розчином геміцелюлолітичних гідролізатів, отриманим способом перетворення лігноцелюлозної біомаси в етанол і, зокрема, отриманим при попередній обробці біомаси.

З іншого боку, можливість використати суміш, дуже насичену цукром, переважно дозволяє обмежувати ризики зараження.

Введення в суміш, що є індукуючим субстратом, ксилози дозволяє істотно збільшити ксиланазну активність кінцевого ферментного коктейлю. Ксилозу можна переважно замінювати розчином геміцелюлозного гідролізату, отриманого гідролізом геміцелюлоз в процесі попередньої обробки лігноцелюлозної біомаси в способах отримання біопалива другого покоління, яке у разі необхідності може бути концентрованим.

Переважно суміш, що є індукуючим субстратом, містить від 50 до 65% мас. глюкози або целюлозних гідролізатів, від 22 до 24% мас. лактози і від 15 до 25% мас. ксилози або розчину геміцелюлозних гідролізатів можливо отриманого внаслідок попередньої обробки лігноцелюлозної біомаси, причому сума компонентів дорівнює 100%.

Найбільш переважно індукуючий субстрат є сумішшю, що складається з 60% мас. глюкози або целюлозних гідролізатів, 23% мас. лактози і 17% мас. ксилози або геміцелюлозних гідролізатів.

Вуглецевий субстрат, що використовується на стадії росту, вибирають з глюкози, ксилози, лактози, залишків, отриманих після етанольної ферментації мономерних цукрів ферментних гідролізатів целюлозної біомаси і/або сирого екстракту водорозчинних пентоз, можливо отриманих при попередній обробці целюлозної біомаси.

Найбільш переважно субстрат росту являє собою глюкозу.

Промислові джерела, що використовуються, які належать до виду *Trichoderma reesei*, модифіковані для поліпшення целюлолітичних і/або геміцелюлолітичних ферментів способами мутація-селекція. Наприклад, можна назвати штам IFP CL847. Можуть також застосовуватися штами, поліпшені технологіями генетичної рекомбінації. Їх слід делегувати для катаболічної репресії за допомогою глюкози (Δ CRE1), як наприклад CL847.

Ці штами культивують в біореакторах, що струшуються і аеруються в умовах, сумісних з їх ростом і продукуванням ферментів. Умови є такими, що рН знаходиться в діапазоні від 3,5 до 6, а температура від 20 до 35°C. Переважно вибирають рН, що дорівнює 4,8, і температуру 27°C на стадії росту і рН, що дорівнює 4, і температуру 25°C на стадії продукування. Міра аерації, виражена в об'ємі повітря на об'єм реакційного середовища на хвилину або vvm, що використовується під час здійснення способу, складає від 0,3 до 1,5 хв.⁻¹, а швидкість обертання або gpr повинна забезпечувати регулювання тиску в O₂ від 20% до 60%. Переважно вибирають аерацію 0,5 vvm і струшування, що забезпечує тиск в O₂ 30%.

За своїй природою вуглецевий субстрат, вибраний для отримання біомаси, вводять в біореактор до стерилізації або стерилізують окремо і вводять в біореактор після стерилізації цього останнього для отримання початкової концентрації цукру від 15 до 60 г/л.

На стадії продукування водний розчин, що містить індукуючий субстрат, що складається з суміші глюкоза/лактоза/ксилоза, або розчин геміцелюлозного гідролізату, вибраний для стадії продукування ферментів, готують в концентрації від 350 до 600 г/л в поживному розчині, що використовується.

Переважно концентрація складає від 450 до 550 г/л.

Водний розчин впорскують після виснаження початкового субстрату так, щоб внести оптимальну кількість. Вхідний потік поживного розчину складає від 30 до 45 мг на грам клітин на годину.

Залишкова концентрація цукру в культурному середовищі менше 1 г/л на стадії продукування ("підживлення"), що обмежує продукування біомаси. Переважно ця концентрація менше 0,5 г/л і ще більш переважно становить 0,1 г/л.

Приклади

З наведених нижче прикладів в прикладі 1 представлена культура, в якій використовується глюкоза як вуглецевий субстрат на стадії росту і на стадії продукування. Цей приклад демонструє низьку продуктивність білків, що отримується, якщо цей цукор використовують як єдиний вуглецевий субстрат, навіть якщо на стадії підживлення потік є таким, що обмежує (залишкова концентрація глюкози близька до 0). У другому прикладі показана контрольна ферментація з використанням лактози як вуглецевого субстрату на стадії росту і на стадії продукування, яка забезпечує високу продуктивність білків. У прикладі 3 відтворюється дослідний експеримент з використанням на стадії продукування суміші, такої як описана в

заявці на патент WO 2009/026716, з високим вмістом ксилози, що дозволяє, на думку авторів, істотно підвищити продукування целюлаз в порівнянні з експериментом, в якому ксилозу або геміцелюлозні похідні використовуються як єдині вуглецеві субстрати. Приклади 4-6 стосуються патенту і способів за даним винаходом.

5 Приклад 1: Продукування ферментів на глюкозі (не стосується винаходу)

Продукування целюлаз здійснюють в біореакторі з механічним струшуванням. Мінеральне середовище має наступний склад: KOH 1,66 г/л, H₃PO₄ 85% 2 мл/л, (NH₄)₂SO₄ 2,8 г/л, MgSO₄ 7 г/л, H₂O 0,6 г/л, CaCl₂ 0,6 г/л, MnSO₄ 3,2 мг/л, ZnSO₄ 7 мг/л, CoCl₂ 10 мг/л, FeSO₄ 7 мг/л, Corn Steep 1,2 г/л, протипінний засіб 0,5 мл/л.

10 Біореактор, що містить мінеральне середовище, стерилізують при 120°C протягом 20 хвилин, вуглецеве джерело - глюкозу стерилізують окремо при 120°C протягом 20 хвилин, потім вводять в біореактор в стерильних умовах так, щоб отримати фінальну концентрацію 30 г/л. В біореактор висівають при 10% (v/v) рідку прекультуру штаму *Trichoderma reesei* CL847. Мінеральне середовище прекультури ідентичне тому, що знаходиться в біореакторі за винятком додання фталату калію в концентрації 5 г/л¹ для тампонування pH. Ріст грибка в прекультурі відбувається з використанням глюкози як вуглецевого субстрату в концентрації 30 г/л. Ріст інокуляту продовжується від 2 до 3 днів і проходить при 28°C в інкубаторі в умовах струшування. Перехід до біореактору здійснюється, якщо залишкова концентрація глюкози менше 15 г/л.

20 Експеримент в біореакторі включає в себе дві стадії:

- стадію росту на вуглецевому субстраті - глюкозі (початкова концентрація = 30 г/л) при температурі 27°C і pH 4,8 (регулюється аміаком 5,5 М). Аерація становить 0,5 vvm і струшування посилюється до 200-800 rpm в залежності від pO₂ (тиск розчиненого кисню), який підтримується вище 30%.

25 - Стадія отримання ферментів. Коли початковий субстрат в ферментаторі виснажується, розчин глюкози 250 г/л безперервно впорскують з витратою від 30 до 40 мг на г клітин на годину до 164 годин. Температуру знижують до 25°C і pH 4 до кінця культивування. pH регулюється шляхом додання розчину аміаку 5,5 н., який вносить азот, необхідний для синтезу екскретованих білків. Вміст розчиненого кисню підтримують вище 15-20% шляхом аерації і струшування.

Після продукування ферментів йде титрування екстрацелюлярних білків методом Лоурі і у відповідності зі стандартом BSA після відділення міцелію фільтруванням або центрифугуванням. Визначеними видами целюлолітичної активності є:

35 - Активність фільтрувального паперу (UPF: одиниця фільтрувального паперу), яка дозволяє титрувати загальну активність ферментного пулу ендоглюканаз і екзоглюканаз;

- Активність арил-β-глюкозидази і ксиланаз для специфічних видів активності.

Активність UPF вимірюють по паперу Whatman n 1 (процедура, рекомендована комісією з біотехнології IUPAC) в початковій концентрації 50 г/л; беруть пробу ферментного розчину, що аналізується, який вивільняє еквівалент 2

40 Вуглецевим субстратом на стадіях росту і продукування є чиста лактоза. Лактоза є важливим індуктором при продукуванні целюлаз. Це субстрат, що найбільше використовується в промисловості для продукування целюлаз.

Через 30 годин росту, після виснаження початкового субстрату безперервно вводять підживлюючий розчин в концентрації 250 г/л з витратою 35 мг на г клітин на годину до 164 годин.

Аналітичне визначення по кінцевому суслу дає наступні результати:

Біомаса г/л 13,5

Білки г/л 37,8

UPF IU/мл 22,1

50 Ксиланаз 408,5 IU/мг

Специфічна β-глюкозидаза 0,96 IU/мг.

Приклад 3: Продукування з використанням суміші 97% ксилоза/3% цукрів-індукторів продукування целюлаз або CIC (не за винаходом)

Експеримент проводиться в тих же умовах, що і в прикладі 1 з використанням чистої ксилози як єдиного вуглецевого субстрату на стадії росту і на стадії продукування суміші 97% ксилоза/3% CIC, представлений в патентній заявці WO 2009/026716 A1. CIC (цукри-індуктори продукування целюлаз) являють собою суміш цукрів, що забезпечує індукцію продукування целюлаз. Її склад є наступним: 56% гентіобіози, 14% софорози, 10% трегалози, 6% целобіози, 6% мальтотриози, 8% глюкози.

Після виснаження початкового субстрату суміш 97% ксилоза/3% СІС в концентрації 360 г/л впорскують відповідно до описаних рекомендацій з витратою 0,4 г вуглецю.. L-1 h-1.

Аналітичне визначення по кінцевому суслу дає наступні результати:

- Біомаса 14,3 г/л
- Білки 18,7 г/л
- UPF 6,4 IU/мл
- Ксиланаза 6000,1 IU/мг
- Специфічний UPF 0,34 IU/мг
- Специфічна β -глюкозидаза 1,15 IU/мг.

- Кінцева продукція білків близька до представленої в патенті WO 2009/026716 A1, де автори отримали кінцеву концентрацію білків 25 г/л з штамом P59G. Специфічна активність FPase (0,34 IU/мг) є слабкою, тоді як активність ксиланаз є дуже високою.

Приклад 4: Протрукування з використанням суміші лактоза (23%)/глюкоза(60%)/ксилоза (17%) в концентрації 500 г/л (за винаходом)

- Експеримент в прикладі 4 проводиться в тих же умовах, що і в прикладі 1 з використанням глюкози як вуглецевого субстрату росту в концентрації 60 г/л. Потім на стадії протрукування в режимі «підживлення» використовують розчин, в якому три вуглецевих субстрати змішані в наступних пропорціях: лактоза (23%)/ глюкоза(60%)/ксилоза (17%) в концентрації 500 г/л. Цю суміш впорскують з розрахунку 45 мг.г⁻¹ год⁻¹. Аналітичне визначення по кінцевому суслу дає наступні результати:

- Біомаса 26,1 г/л
- Білки 61,8 г/л
- UPF 33,7 IU/мл
- Ксиланаза 4017 IU/мг
- Специфічний UPF 0,55 IU/мг
- Специфічна β -глюкозидаза 1,2 IU/мг.

Кінцева продукція білків більш ніж в 3 рази перевищує кінцеву продукцію з прикладу 3. Активність фільтрувального паперу, яка є показником целюлазної активності, приблизно в 5 разів вище.

- Ксиланазна активність в 10 разів вище, ніж в прикладі 2, виконаному з використанням лактози як єдиного вуглецевого субстрату росту і протрукування, але приблизно на 50% нижче, ніж в прикладі 3.

Приклад 5: Використання суміші лактоза (23%)/глюкоза(60%)/розчин С5-цукрів (17%) в концентрації 500 г/л (за винаходом)

- Приклад 5 здійснюється в тих же умовах, що і приклад 4. Глюкозу використовують на стадії росту в концентрації 15 г/л. Ксилозу підживлюючого розчину замінюють розчинним геміцелюлозним розчином або розчином С5-цукрів, отриманим з пшеничної соломи, просоченою сірчаною кислотою 0,08 н. і заздалегідь обробленої паровим вибухом (19 бар, 5 хвилин). Суміш впорскують з розрахунку 30 мг.г⁻¹ год⁻¹ протягом 170 годин.

- Аналітичне визначення по кінцевому суслу дає наступні результати:

- Біомаса 19,1 г/л
- Білки 57,3 г/л
- UPF 25,1 IU/мл
- Ксиланаза 1151 IU/мг
- Специфічний UPF 0,44 IU/мг
- Специфічна β -глюкозидаза 1,4 IU/мг.

Цей експеримент дозволив підвищити продукцію білків більш ніж на 50% в порівнянні з прикладом 2 і ксиланазну активність майже в 3 рази. Більшу частину лактози замінили на стадії росту і протрукування глюкозою і розчином С5-цукрів. Концентрація глюкози на стадії росту поменшала в порівнянні з прикладом 4 з 60 до 15 г/л. Концентрація біомаси поменшала з 26 до 19 г/л, але це мало вплинуло на кінцеву концентрацію білків (зниження на 7%). Таким чином, досягнуте максимальне використання цукрів і істотне зниження вартості вуглецевого джерела.

Приклад 6: Використання суміші: лактоза (23%)/С6-гідролізати (56%)/ксилоза (21%) в концентрації 500 г/л (за винаходом)

- Приклад 6 здійснювали в тих же умовах, що і приклад 4. Глюкозу використали на стадії росту в концентрації 15 г/л. Глюкозу в підживлюючому розчині замінили розчином гідролізату, отриманим ферментативним гідролізом пшеничної соломи, просоченої сірчаною кислотою 0,08 н. і заздалегідь обробленої паровим вибухом (19 бар, 5 хвилин). Ферментативний гідроліз пшеничної соломи здійснювали при 50°C і рН 4,8. Він привів до гідролізу 95% целюлози на

глюкози. Лактозу і ксилозу розчиняли в цьому розчині для отримання суміші: лактоза (23%)/С6-гідролізати (56%)/ксилоза (21%) в концентрації 500 г/л.

Суміш впорскували з розрахунку 30 мг.г.⁻¹ год.⁻¹ протягом 170 годин на стадії підживлення.

Аналітичне визначення по кінцевому суслу дає наступні результати:

- 5 Біомаса 16,1 г/л
- Білки 43,1 г/л
- UPF 31,4 IU/мл
- Ксиланаза 6595,1 IU/мг
- Специфічний UPF 0,73 IU/мг
- 10 Специфічна β-глюкозидаза 1,2 IU/мг.

Отриманий ферментний коктейль має дуже хорошу якість, оскільки кінцева активність FPase є близькою до активності, досягнутої в прикладі 4, навіть якщо концентрація білків є більш слабкою. Кінцева активність FPase приблизно в 5 разів перевищує ту, яка отримана в прикладі 3 і приблизно на 50% вище отриманої в прикладі 2, в якій лактоза використовується як єдиний вуглецевий субстрат на стадії підживлення.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб отримання ферментів целюлази і/або геміцелюлази мікроорганізмом, що включає щонайменше одну стадію зростання в присутності вуглецевого джерела і щонайменше одну стадію продукування в присутності індукуючого субстрату, в якому вказаний індукуючий субстрат є сумішшю глюкози або целюлозних гідролізаторів, лактози і ксилози або розчину геміцелюлолітичних гідролізаторів, причому вміст кожного з компонентів суміші визначений в наступних межах:
 - 25 від 40 до 65 % мас. глюкози або целюлозних гідролізаторів,
 - від 21 до 25 % мас. лактози і
 - від 10 до 39 % мас. ксилози або розчину геміцелюлозних гідролізаторів,
 - причому сумарна кількість цих трьох компонентів дорівнює 100 %;
 - при цьому вказаний мікроорганізм належить до виду *Trichoderma reesei* і делетується для катаболітної репресії глюкозою.
2. Спосіб за п. 1, в якому мікроорганізм вибраний із штаму CL847.
3. Спосіб за п. 1 або 2, в якому внесення індукуючого субстрату здійснюється в розчині, причому концентрація індукуючого субстрату в поживному розчині, що використовується на стадії продукування, складає від 350 до 600 г/л.
- 35 4. Спосіб за п. 3, в якому концентрація складає від 450 до 550 г/л.
5. Спосіб за п.1 або 2, в якому суміш, що є індукуючим субстратом, містить від 50 до 65 % мас. глюкози або целюлозних гідролізаторів, від 22 до 24 % мас. лактози і від 15 до 25 % мас. ксилози або розчину геміцелюлозних гідролізаторів, причому сумарна кількість компонентів суміші дорівнює 100 %.
- 40 6. Спосіб за п. 5, в якому індукуючий субстрат є сумішшю, що складається з 60 % мас. глюкози або целюлозних гідролізаторів, 23 % мас. лактози і 17 % мас. ксилози або геміцелюлозних гідролізаторів.
7. Спосіб за п. 1 або 2, в якому вуглецевий субстрат, що використовується на стадії зростання, вибирають з глюкози, ксилози, лактози, залишків, отриманих після етанольної ферментації мономерних цукрів ферментних гідролізаторів целюлозної біомаси і/або сирого екстракту водорозчинних пентоз, можливо отриманих при попередній обробці целюлозної біомаси.
- 45 8. Спосіб за п. 1 або 2, в якому значення рН підтримують в діапазоні від 3,5 до 6, а температура складає від 20 до 35 °С.
9. Спосіб за п. 1 або 2, в якому вхідний потік поживного розчину складає від 30 до 45 мг на грам клітин на годину.
- 50 10. Спосіб за п. 1 або 2, в якому залишкова концентрація цукру в культурному середовищі на стадії продукування менше 1 г/л, переважно 0,5 г/л і ще більш переважно 0,1 г/л.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601