

Дана заявка претендує на пріоритет попередньої заявки США №60/384,333, поданої 30 травня 2002 р. Даний винахід був створений за підтримки уряду США згідно з Контрактом №DE-FC-36-00G010598 від Департаменту енергетики. Уряд США має в даному винаході певну частину прав.

Молочна кислота широко застосовується в промисловості і, в тому числі, в хімічній переробці та синтезі, косметичі, фармацевтичному виробництві, виробленні пластмас і в харчовій промисловості. У найбільших промислових масштабах молочну кислоту одержують за допомогою процесів ферментації. У таких процесах використовувалися найрізноманітніші бактерії-продуценти молочної кислоти.

Останнім часом проводилися дослідження з використання рекомбінантних дріжджових штамів у процесах ферментації молочної кислоти. Рекомбінантні дріжджі мають потенційну спроможність надати ряд переваг порівняно з бактеріальною ферментацією. Деякі дріжджові штами є більш стійкими до високих температур. Це могло б дозволити ферментацію при вищих температурах, а отже і на більшій швидкості ферментації. Краща толерантність до високих температур полегшує задачу очищення ферментаційного середовища від мікробів, що його забруднюють, оскільки це середовище можна в такому разі просто нагрівати до температури, при якій небажані види гинуть, а бажані залишаються живими. Бактерії-продуценти молочної кислоти, такі, як *Lactobacilli*, потребують для підвищення ефективності виробничого процесу більш складного ферментаційного середовища. Складність ферментаційного середовища підвищує вартість сировинних матеріалів і робить більш складним і дорогим відділення молочної кислоти від ферментаційного середовища. Використання ж рекомбінантних дріжджів дає можливість зменшувати виробничі витрати завдяки застосуванню спрощеного ферментаційного середовища.

Поро (Porro) зі співробітниками спробували за допомогою методів генної інженерії вивести дріжджі, що продукують молочну кислоту, шляхом вставлення екзогенного LDH-гена (лактатдегідрогенази) в клітини дріжджів видів *S. cerevisiae*, *K. lactic*, *T. delbrueckii* та *Z. Bailii* і розривання природного метаболічного шляху пірувату цих клітин [Porro et al., "Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid", *Biotechnol. Prog.* 1995 May-Jun; 11(3): 294-8; Porro et al., "Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts", *App. Environ. Microbiol.* 1999 Sep; 65(9):4211-5; Bianchi et al., "Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous LDH gene", *App. Environ. Microbiol.* 2001 Dec; 67(12) 5621-5]. Поро зі співроб. спромоглися виробити рекомбінантні дріжджі, що продукували молочну кислоту, але ці штами працювали недостатньо добре для того, щоб їх можна було застосовувати у промислових процесах. Для визнання штаму придатним до промислового застосування він повинен давати достатньо високий вихід молочної кислоти (тобто забезпечувати високе перетворення субстрату на молочну кислоту) і мати високу продуктивність (тобто швидке метаболічне перетворення субстрату на молочну кислоту). Такі дріжджі повинні також витримувати середовище з високим титром молочної кислоти.

Нешодавно Раджгарія (Rajgarhia) зі співроб. створили рекомбінантні дріжджі, які демонстрували більш високі вихід продукту і продуктивність, ніж дріжджі Поро, див., наприклад, [WO 00/71738, WO 2/42471 і PCT/US02/16223]. У роботі Раджгарія [WO 00/71738] була здійснена спроба використати переваги так званого "Крабтри-негативного" фенотипу, що проявляється деякими видами дріжджів. Ефект Крабтри (Crabtree) є відомим як явище ферментативного метаболізму в аеробних умовах, викликаний інгібуванням споживання кисню мікроорганізмом, що культивується з високими питомими швидкостями росту (довготривалий ефект) або при наявності високих концентрацій глюкози (короткотривалий ефект). Крабтри-негативні фенотипи цього ефекту не вказують і, таким чином, є здатними споживати кисень навіть при наявності високих концентрацій глюкози або при високих швидкостях росту. Таким чином, культури Крабтри-негативних мікроорганізмів, принаймні теоретично, можна переводити із фази культивування у фазу ферментації (виробничу фазу) шляхом регулювання постачання кисню. В умовах значної аерації мікроорганізми ростуть, продукуючи біоматеріал і CO<sub>2</sub>, у той час як в анаеробних умовах клітини замість цього піддають ферментації доступний субстрат, виробляючи молочну кислоту або інші продукти збродування.

Проте авторами даного винаходу було знайдено, що ферментація деякими штамами здійснюється не так ефективно, як було б бажано мати в строгих анаеробних умовах. Це спостерігається, наприклад, у генетично модифікованих дріжджових штаммах, у котрих шлях метаболізму піруватдекарбоксилази (PDC) є делетований або розірваний. Але одержувані таким способом види було б дуже бажано використовувати у ферментації молочної кислоти (а також інших продуктів, що не є етанолом), оскільки розривання шляху PDC зменшує кількість етанолу, що продукується. Отже очевидною стає потреба у створенні поліпшеного процесу ферментації, в котрому штам, що у строгих анаеробних умовах зброджує неефективно, є здатним виробляти бажаний продукт ферментації із забезпеченням високої економічності процесу.

На Фіг.1 показаний графік, що ілюструє вплив OUR на споживання глюкози, продукування молочної кислоти і на корисний вихід для деяких генетично модифікованих видів *K. marxianus*.

На Фіг.2 показаний графік, що ілюструє вплив OUR на споживання глюкози, продукування молочної кислоти і на корисний вихід для інших генетично модифікованих видів *K. marxianus*.

Даним винаходом в одній із його ознак є процес ферментації, в котрому питому швидкість поглинання кисню контролюють протягом виробничої фази цього процесу ферментації і, принаймні, один робочий параметр регулюють відповідно до виміряної швидкості поглинання кисню.

У другій його ознаці даним винаходом є спосіб здійснення процесу ферментації у ферментаційному середовищі, що містить ферментуючий мікроорганізм, субстрат, що піддається ферментації цим мікроорганізмом, де ферментаційне середовище показує кількість розчиненого кисню (DO: dissolved oxygen) і питома поглинання кисню (OUR) під час ферментації, який включає у себе:

а) вимірювання OUR протягом виробничої фази ферментації;  
б) регулювання умов аерації так, щоб підтримувати OUR у заданих межах, підтримуючи при цьому DO на рівні нижче 1% від рівня насичення під час виробничої фази ферментації.

У третій його ознаці даним винаходом є процес, який включає у себе:

а) визначення оптимального діапазону величин OUR, при котрих ферментуючий мікроорганізм перетворює вуглевод у бажаний продукт ферментації;

б) культивування мікроорганізму в середовищі, що містить вуглеводень, який піддається метаболічному перетворенню клітиною, і одну чи більше живильних речовин, при аерації цього середовища таким чином, що коли клітини ростуть і репродукуються, DO в середовищі зменшується до рівня менше 1% від величини насичення, і клітини показують питому швидкість поглинання кисню не менше 10ммоль  $O_2$ /грам сухої маси клітин за годину (ммоль  $O_2$ /г с.м./год.); і після цього

с) культивування мікроорганізму в буферному середовищі в умовах ферментації, включаючи умови мікроаерації, достатні для забезпечення культури питомою швидкістю поглинання кисню (OUR) в оптимальному діапазоні.

В іншій його ознаці даний винахід являє собою процес ферментації, що включає у себе:

а) культивування генетично модифікованих дріжджових клітин, що мають розірваний шлях метаболізму PDC і екзогенний ген, що дозволяє клітині виробляти бажаний продукт ферментації у середовищі, котре містить вуглевод, що піддається метаболічному перетворенню цією клітиною, при аерації цього середовища таким чином, що коли клітини ростуть і репродукуються, кількість розчиненого кисню в середовищі знижується до рівня менше 1% від величини насичення, і клітини показують питому швидкість поглинання кисню менше 10ммоль  $O_2$ /г сухої маси клітин за годину (ммоль  $O_2$ /г с.м./год.); і після цього

б) культивування клітин у буферному середовищі в умовах ферментації, включаючи умови мікроаерації, достатні для забезпечення культури питомою швидкістю поглинання кисню (OUR) в межах, приблизно, від 0,8 до 3,0ммоль  $O_2$ /г с.м./год.

Авторами було знайдено, що використання умов мікроаерації та швидкості поглинання кисню як параметра для регулювання процесу дозволяє оптимізувати процес ферментації, врівноважуючи високий вихід бажаного продукту ферментації з доброю швидкістю виробничого процесу. Вимірювання OUR можуть використовуватися для встановлення і регулювання деяких параметрів процесу ферментації з метою підтримання оптимальних умов у виробничій фазі цього процесу.

Параметр OUR являє собою швидкість споживання кисню ( $O_2$ ) на одиницю сухої маси мікроорганізму за одиницю часу. OUR можна вигідно визначати, виходячи з кількості кисню, що споживається за одиницю часу, і з маси клітин протягом цього часу. Споживання кисню визначають шляхом вимірювання кількості кисню, введенного у ферментаційну посудину і виведеного із неї за одиницю часу. Отже величина OUR отримується діленням кількості спожитого кисню на суху масу біоречовини в бульйоні. Маса біоречовини може бути визначена шляхом відбирання зразка, вимірювання концентрації в ньому клітин (маса/об'єм) і множення цієї концентрації на загальний об'єм бульйону. Кількість уведеного кисню може бути виміряна безпосередньо за даними моніторингу швидкості аерації. Кількість кисню, виведеного із ферментаційної посудини, може бути виміряна за допомогою будь-якого відомого методу і, зокрема, за допомогою мас-спектроскопії, що є в даному випадку особливо підходящим. Різниця між кількістю введенного кисню і кількістю видаленого кисню показує, таким чином, кількість кисню, спожитого клітинами. Величину OUR обчислюють шляхом ділення кількості спожитого кисню на суху масу клітин і тривалість часу спостережень. Виражають OUR у мілімолях  $O_2$  на грам (сухої маси) клітин за годину.

У найбільш загальному варіанті здійснення винаходу проводять вимірювання OUR протягом виробничої фази ферментації і регулюють, принаймні, один параметр процесу ферментації відповідно до вимірних величин OUR. Параметром, котрий регулюють у відповідність з вимірною величиною OUR і звичайно пов'язується з аерацією ферментаційного бульйону, є, наприклад, швидкість аерації, швидкість перемішування, склад аераційного газу (наприклад, збільшення або зменшення концентрації кисню в газі), або ж інший параметр, що впливає на швидкість, з якою мікроорганізми в бульйоні споживають кисень.

У кращому варіанті здійснення винаходу ферментуючі клітини культивуються в різноманітних умовах аерації з метою емпіричного встановлення оптимального діапазону величин OUR для конкретного типу клітин. Оптимальний діапазон OUR у загальному випадку залежить від декількох чинників, серед яких найголовнішими є три такі: вихід бажаного продукту ферментації із ферментаційного субстрату (звичайно виражений у грамах продукту на грам витраченого субстрату), питома продуктивність одержання бажаного продукту ферментації (звичайно виражається як маса продукту, поділена на суху масу клітин і на час) і швидкість споживання субстрату (що виражається, звичайно, як маса субстрату, спожитого за одиницю часу). Ці чинники не завжди є всі оптимізовані в одних і тих самих умовах. Наприклад, швидкість споживання субстрату іноді зростає зі зростанням OUR, але вихід при цьому має тенденцію до зниження, протидіючи таким чином підвищенню швидкості виробничого процесу зі збільшенням втрат виходу продукту і погіршуючи економічні показники процесу. Встановлення оптимального діапазону величин OUR у загальному випадку спричиняє врівноваження швидкостей з виходом продукту для оптимізації усіх економічних показників процесу. Якщо встановлюється бажаний діапазон величин OUR, то умови ферментації вибирають у виробничу фазу ферментації для встановлення і підтримання OUR в цих межах. Як і раніше, величини OUR виміряють під час виробничого процесу і підтримують у визначеному діапазоні шляхом регулювання одного чи більше параметрів ферментації.

У виробничу фазу концентрацію розчиненого кисню підтримують приблизно на нульовому рівні, що відбиває умову того, що клітини при цьому споживають кисень приблизно з такою самою швидкістю, з

якою він розчиняється у ферментаційному бульйоні. Концентрація розчиненого кисню під час виробничої фази в загальному випадку є нижчою 1% від рівня насичення (тобто від максимальної кількості кисню, яка може бути розчинена в даному бульйоні в даних умовах температури і тиску). Звичайно, підходящим є вміст розчиненого кисню на рівні менше ніж, приблизно, 10ммоль/л і краще - на рівні менше ніж, приблизно, 5ммоль/л. У найкращому варіанті вміст розчиненого кисню є практично нульовим. Концентрацію розчиненого кисню звичайно вимірюють за допомогою кисневого електроду з газопроникною мембраною (електроду Кларка), який випускається, наприклад, фірмою "Ingold" і розповсюджується фірмою "B Braum" під номерами 33182418 і 33182400. Здійснення виробничого процесу з рівнями розчиненого кисню нижче межі виявлення таких вимірювальних інструментів вважається таким, що відповідає приблизно нульовій концентрації розчиненого кисню згідно з цілями даного винаходу.

В особливо кращому варіанті здійснення винаходу мікроорганізм культивують у різних умовах росту і виробничого процесу. У фазу росту мікроорганізм перебуває в аеробних умовах. Клітини вирощуються в середовищі що містить воду, вуглевод, який вони здатні переробляти шляхом метаболізму як у фазу росту, так і у виробничу фазу, і різноманітні живильні речовини, які більш повною мірою описані нижче. Умови аерації вибирають таким чином, щоб (1) клітини показували питому швидкість поглинання кисню (OUR) не менше 10ммоль  $O_2$ /г с.м./год. і (2) наприкінці фази росту концентрація розчиненого кисню (DO) в середовищі знижувалася до рівня менше, ніж 1% від рівня насичення при підтриманні OUR на рівні, принаймні, 10ммоль  $O_2$ /г с.м./год. Величина OUR у кращому варіанті складає, принаймні, 15, а в більш кращому - принаймні 18ммоль  $O_2$ /г с.м./год. У фазу росту величина OUR в найкращому варіанті є такою високою, яку тільки можуть дати живі клітини. Отже максимальна величина OUR залежать певною мірою від використовуваних дріжджових клітин, виведених шляхом генної інженерії. У загальному випадку очікується, що максимальна величина OUR буде складати, приблизно, 20-30ммоль  $O_2$ /г с.м./год. Клітини *K. marxianus*, що мають розрив PDC-шляху й екзогенний LDH-ген, виказують здатність давати максимальну величину OUR в межах, приблизно, 20-22ммоль  $O_2$ /г с.м./год.

Рівень DO може бути і в кращому варіанті є вище нуля протягом більшої частини фази росту за умови, що він знижується, приблизно, до нуля наприкінці цієї фази. Отже, надлишок кисню більше цього рівня, що потребується для підтримання необхідної величини OUR, може вводитися в середовище на протязі більшої частини фази росту і особливо на протязі періоду, під час якого клітини ростуть за експонентою. Оскільки загальне поглинання кисню під час фази росту збільшується разом з репродукуванням клітин і накопиченням біоматеріалу, загальна кількість кисню, що потребується для підтримання постійного рівня OUR, буде зростати. Проте, оскільки DO наприкінці фази росту може відігравати позитивну роль, аерацію краще проводити таким чином, щоб кисень постачався з надлишком на початку і протягом експоненціальної стадії фази росту. Зі збільшенням накопиченого біоматеріалу загальна кількість кисню, спожитого клітинами, зростає до рівня, на якому кількість постаченого кисню майже дорівнює кількості кисню, спожитого клітинами, внаслідок DO чого падає. Отже, постійні умови аерації можуть використовуватися у фазу росту, якщо вони вибираються таким чином, що DO падає до нуля разом з потрібною величиною OUR, коли кількість виробленої маси досягає заданого рівня. В альтернативному варіанті умови аерації у фазу росту можуть змінюватися за умови, що величина OUR підтримується на заданому рівні, а DO наприкінці фази росту стає приблизно нульовою.

Як тільки DO падає приблизно до нуля, а вироблений біоматеріал досягає бажаної кількості, ці умови аерації (OUR принаймні 10ммоль  $O_2$ /г с.м./год. і DO = 0) слід підтримувати протягом певного часу перш, ніж переходити до виробничої фази. Цей час складає приблизно від 15 хвилин до 2 годин і в кращому варіанті - від 30 до 90 хвилин. Найкращою є тривалість цього проміжку часу, приблизно, від 45 до 75 хвилин. Якщо мікроорганізм переключають на виробничу фазу надто швидко, то клітини будуть давати низьку швидкість продукування. Якщо ж зазначені умови аерації тривають занадто довго, то клітини будуть давати низький вихід бажаного продукту ферментації, а також низьку швидкість продукування.

Культуру переключають на виробничу фазу шляхом змінювання умов аерації. У виробничу фазу умови аерації добирають таким чином, щоб величина OUR підтримувалася у заданому діапазоні, як це зазначалося вище. Деякі мікроорганізми виказують потребу у метаболічному перетворенні малої кількості кисню для підтримання загальної життєздатності і здоров'я клітини. Такими мікроорганізмами є, наприклад, генетично модифіковані дріжджі, що мають розрив PDC-шляху і, зокрема, мікроорганізми, що мають екзогенний ген, який дозволяє їм продукувати певний продукт ферментації. У цілком анаеробних умовах швидкість споживання субстрату і швидкість вироблення продукту ферментації, які демонструють ці клітини, звичайно є дуже низькими. Крім того, втрати зазнає при цьому також вихід бажаного продукту ферментації. У мікроаеробних умовах при певних величинах OUR, що залежать від конкретного штаму, клітини є здатними метаболічно перетворювати субстрат з набагато більшою швидкістю. Результатом цього є зростання швидкостей споживання субстрату і вироблення бажаного продукту ферментації. Але як тільки споживання кисню, зростаючи, перевищує певний рівень, вихід бажаного продукту зменшується, оскільки більша частина субстрату перетворюється на двоокис вуглецю. Крім того, коли величина OUR перевищує певний рівень, крива швидкості вироблення продукту виходить на сплюснену ділянку або навіть знижується, і втрати виходу продукту більше не компенсуються підвищенням швидкості його вироблення. Отже підтримування величини OUR у певних межах під час виробничої фази дозволяє досягати економічно оптимального врівноваження між виходом продукту і швидкістю його вироблення.

Оптимальна величина OUR деякою мірою залежить від використовуваного мікроорганізму, хоча у загальному випадку діапазон OUR лежить у межах, приблизно, від 0,8 до 3ммоль  $O_2$ /г с.м./год. Оптимальні величини OUR для конкретного мікроорганізму легко визначаються емпіричним шляхом. Нижній край кращого діапазону OUR визначається величиною, приблизно, 1,0ммоль  $O_2$ /г с.м./год., а в ще кращому

варіанти - 1,2ммоль  $O_2$ /г с.м./год. Верхній край кращого діапазону OUR визначається величиною, приблизно, 2,5ммоль  $O_2$ /г с.м./год., а в ще кращому варіанті - 2,0ммоль  $O_2$ /г с.м./год.

Величина OUR, отримувана від культури, великою мірою залежить від самого мікроорганізму та умов аерації. Умови аерації впливають на кількість кисню, що розчиняється в культуральному середовищі і, таким чином, стає доступним для цього мікроорганізму. Для даного мікроорганізму OUR підвищенню сприяє (1) зростання швидкості постачання кисню і (2) утворення дрібних кисневих пухирців (для поліпшення масопереносу молекул кисню в рідку фазу). Утворення пухирців можна легко здійснювати шляхом барботування і/або перемішування.

Швидкість аерації у фазу росту може складати, наприклад, приблизно від принаймні 0,2 об'єму повітря/об'єм ферментаційного середовища/хв. (об./об./хв.), у кращому варіанті - приблизно від 0,3 до 2об./об./хв., а в ще кращому - приблизно від 0,4 до 1об./об./хв. У виробничу фазу цей інтервал лежить у межах, приблизно, від 0,01 до 0,1об./об./хв., краще - від 0,02 до 0,75об./об./хв. і найкраще - від 0,02 до 0,5об./об./хв. У тих випадках коли як аераційний газ використовується кисень, зазначені об'єми пропорційно зменшуються. Аерацію краще здійснювати в умовах, наприклад, барботування, що сприяють утворенню дрібних пухирців газу. Позитивним чинником при цьому є перемішування і, особливо, коли потребуються високі величини OUR. Звичайно швидкість аерації і перемішування добирають невід'ємно одна від одної з метою досягнення бажаних величин OUR.

У тому випадку, коли продуктом ферментації є кислота, середовище під час виробничої фази буферизують таким чином, щоб його рН підтримати в межах, приблизно, від 5,0 до 9,0, а в кращому варіанті - від 5,5 до 7,0. Підходящими для цього буферними агентами є основні матеріали, що нейтралізують молочну кислоту при її утворенні. Це є, наприклад, гідроксид кальцію, карбонат кальцію, гідроксид натрію, гідроксид калію, карбонат калію, карбонат натрію, карбонат амонію, аміак, гідроксид амонію і т.д. У загальному випадку використовуватися можуть також буферні агенти, які застосовуються у звичайних процесах ферментації.

Інші умови ферментації, такі, як температура, густина клітин, субстрат або субстрати, живильні речовини тощо, не вважаються критичними для даного винаходу і можуть добиратися з точки зору економічності процесу. Температури як у фазу росту, так і у виробничу фазу можуть варіювати від температури заморожування ферментаційного середовища до температури вище 50°C, хоча оптимальна температура звичайно певною мірою залежить від конкретного мікроорганізму, що використовується. У кращому варіанті температура процесу особливо на виробничій фазі лежить у межах 30-45°C. Так, наприклад, виведені за допомогою методів генної інженерії клітини *K. Marxiopus*, витримують відносно високі температури (приблизно від 40 до 50°C, і особливо до 45°C). Інший, підходящий вид клітин, *S. Sonorensis* здатний витримувати температури до 40°C. Цей температурний діапазон дає можливість проводити ферментацію при таких підвищених температурах (знижуючи тим самим витрати на охолодження) без значних втрат продуктивності. Іншою перевагою, що дає здатність мікроорганізму витримувати високі температури, є те, що в разі забруднення ферментаційного середовища небажаними мікроорганізмами, останні можуть бути селективно вбиті нагрівом ферментаційного середовища до 40°C і вище і, зокрема, до 45°C і вище, не завдаючи значної шкоди бажаним клітинам за даним винаходом.

У виробничу фазу концентрація клітин у ферментаційному середовищі звичайно лежить у межах, приблизно, 1-150, у кращому варіанті - у межах, приблизно, 3-10, а в ще кращому - в межах, приблизно, 3-6г сухих клітин на літр ферментаційного середовища.

Добір вуглеводу для ферментаційного середовища залежить від використовуваної клітини-хазяїна і від того, чи розрахована дана клітина-хазяїн, що була виведена із застосуванням генної інженерії, на метаболічне перетворення цього вуглеводу на піруват. Кращими вуглеводами при цьому є гексозні цукри, такі, як глюкоза, фруктоза, глюкозні олігомери, такі, як мальтоза, ізомальтоза, мальтотриоза, крохмаль і мальтодекстрини. У випадку олігомерних цукрів може потребуватися додавання до ферментаційного бульйону ферментів з метою перетравлення цих олігомерів на мономерний цукор. Підходящим пентозним цукром є, наприклад, ксиліоза. Найкращою при цьому є глюкоза.

При буферній ферментації кислотні продукти ферментації, такі, як молочна кислота, при їх утворенні нейтралізуються у відповідний лактат. Отже відновлення кислоти спричиняє регенерацію вільної кислоти. Звичайно це здійснюється шляхом видалення клітин і підкислення ферментаційного бульйону сильною кислотою, якою може бути, наприклад, сірчана кислота. Утворювана побічна сіль (якою в тих випадках, коли як нейтралізатор використовується сіль кальцію, а як підкислювач - сірчана кислота, є сульфат кальцію) відокремлюється від кислоти. Після цього кислоту відновлюють за допомогою таких методів, як екстракція рідких речовин рідинами, дистиляція, абсорбція та інші, описані, наприклад, у [T.B. Vickroy, Vol. 3, Chapter 38 of Comprehensive Biotechnology, (ed. M. Moo-Young), Pergamon, Oxford, 1985; R. Datta, et al., FEMS Microbiol. Rev., 1995; 16:221-231; U.S. Patent Nos. 4,275,234, 4,771,001, 5,132,456, 5,420,304, 5,510,526, 5,641,406, 5,831,122, і Міжнародна патентна заявка №: WO 93/00440].

Ферментаційне середовище звичайно містить живильні речовини, потрібні для даних клітин, включаючи джерело азоту (наприклад, амінокислоти, білки, неорганічні джерела азоту, такі, як аміак або солі амонію, тощо), різноманітні вітаміни, мінерали і т.п.

Процес за даним винаходом може здійснюватися у безперервному режимі, періодичному режимі або в комбінованому режимі того та іншого.

Мікроорганізмом для використання в процесі за даним винаходом може бути будь-який мікроорганізм, котрий (1) перетворює шляхом ферментації вуглевод на бажаний продукт і (2) здійснює ферментацію більш ефективно у мікроаеробних умовах, ніж у жорстких анаеробних умовах. Особливо прийнятними для цього є деякі генетично модифіковані дріжджові клітини, які відрізняються тим, що вони мають (1)

розірваний PDC-шлях і (2) принаймні один функціональний екзогенний ген, що дозволяє клітині виробляти бажаний продукт ферментації. Такого роду підходящі дріжджові клітини описані, наприклад, у [Porro et al., "Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid", Biotechnol Prog. 1995 May-Jun; 11(3): 294-8; Porro et al., "Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts", App. Environ. Microbiol. 1999 Sep; 65(9): 4211-5; Bianchi et al., "Efficient homolactic-fermentation by *Metformin lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous LDH gene", App. Environ. Microbiol. 2001 Dec; 67(12): 5621-5; WO 00/71738, WO 02/42471, PCT/US02/16223, і попередня заявка США №60/384,333, подана 30 травня 2002 р.]. У кращому, варіанті дана клітина також виказує Крабтри-негативний фенотип, тобто вона дихає і росте в умовах аерації, наявності високих концентрацій глюкози і високих питомих швидкостей росту.

Використовуваний тут термін "розірваний" означає, що нативний шлях метаболізму PDC був змінений таким чином, що функція шляху PDC стала зменшеною, принаймні, на 90%. Розрив може досягатися змінюванням шляху метаболізму (або одного чи більше генів, зв'язаних зі шляхом метаболізму) таким чином, що функція шляху зменшується або вилучається, або ж видаленням одного чи більше генів, потрібних для функціонування даного шляху. Кращою клітиною є така, що має делецію PPC-гена.

Кращим екзогенним геном є лактатдегідрогеназний (LDH) ген. Цей ген у кращому варіанті вбудовується в геном клітини. Генетично модифікована дріжджова клітина може мати одну копію або множину копій екзогенного LDH-гена. Вона може містити два чи більше різних LDH-генів. У ще кращому варіанті здійснення винаходу цей ген інтегрується в геном клітини на місце нативного PDC-гена, який делетується. В особливо кращому варіанті здійснення винаходу LDH-ген перебуває під функціональним керуванням з боку оперативних промоторних і термінаторних послідовностей, що є принаймні на 90% гомологічними промоторним і термінаторним послідовностям (зокрема, промоторним і термінаторним послідовностям PDC), що є нативними для даної клітини. Зазначені кращі й особливо кращі клітини описані більш докладно в попередній патентній заявці США №60/384,333 від 30 травня 2002 р., включений тут шляхом посилання.

Штамами, що мають підходящі L-лактатдегідрогеназні гени, котрі можуть бути клоновані для застосування у виробленні технологічних дріжджів, є *Lactobacillus helveticus*, *Pediococcus acidolactid*, *Lactobacillus casei*, *Kluveromyces thermotolerans*, *Torulaspora delbrueckii*, *Schizosaccharomyces pombe* і *B. megaterium*. Кращими серед них є два L-лактатдегідрогеназні гени - *L. helveticus* і *B. Megaterium* L-лактатдегідрогеназа. Штамами, що мають підходящі D-лактатдегідрогенази, які можуть бути клоновані для використання в модифікованих дріжджах, є *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum* і *Lactobacillus pentosus*. Кращим серед них D-лактатдегідрогеназним геном є *L. helveticus* D-лактатдегідрогеназа.

Для можливості промислового застосування генетично модифікована клітина повинна мати декілька таких властивостей. Дріжджі повинні перетворювати значну частину вуглеводу на бажаний продукт ферментації (тобто давати високий вихід продукту). Вона повинна забезпечувати високу питому продуктивність, тобто виробляти велику кількість продукту ферментації відносно маси клітини за одиницю часу. Бажано також, щоб така клітина була толерантною до високих концентрацій продукту ферментації. Остання з цих властивостей дозволяє у процесі ферментації використовувати високі концентрації сировинного вуглеводу.

У загальному випадку вважається за бажане, щоб процес ферментації згідно з даним винаходом мав деякі або всі перелічені нижче ознаки.

А. Вихід продукту: принаймні 30, краще - принаймні 40, ще краще - принаймні 60 і ще краще - принаймні 75г продукту ферментації на грам субстрату. Теоретично бажаний вихід продукту у такому процесі становить 100%, але на практиці він обмежується величиною, приблизно, 98%.

В. Питома продуктивність: принаймні 0,1, краще - принаймні 0,3, ще краще - принаймні 0,4 і ще краще - принаймні 0,5г продукту ферментації на грам клітин за годину. Питому продуктивність бажано мати якомога більшою.

С. Титр (максимальна концентрація продукту ферментації): принаймні 15г на літр ферментаційного середовища, краще - принаймні 20г/л, ще краще - принаймні 40г/л, ще краще - принаймні 80г/л, до 150г/л, і краще - приблизно до 120г/л. У випадку молочної кислоти температура ферментаційного середовища деякою мірою впливає на верхній край титрів, що легко досягається, оскільки високонцентровані розчини молочної кислоти (тобто, близько 150г/л) мають схильність до того, щоб ставати дуже в'язкими або гелеподібними при температурах нижче, ніж приблизно 35°C. Застосування більш високих температур ферментації, наприклад, у межах 35-50°C дозволяє на більші титри без небезпеки гелеутворення або небажаного підвищення в'язкості.

Крім того, процес ферментації за даним винаходом у кращому варіанті досягає високої об'ємної продуктивності. Об'ємна продуктивність виражається в кількості продукту, виробленого на одиницю об'єму ферментаційного середовища за одиницю часу, звичайно, в грамах продукту на літр середовища за годину. Бажаною є об'ємна продуктивність, принаймні, 1,5г/л/год., краще - принаймні, 2,0г/л/год. і ще краще - принаймні, 2,5г/л/год. В умовах кращої густини клітин до 3-6 клітин на літр ферментаційного середовища максимальна продуктивність становить, приблизно, 5,0г/л/год., а в більш типових випадках - приблизно, 4,0г/л/год. Ферментацію дуже бажано проводити таким чином, щоб зазначені тут величини об'ємної продуктивності досягалися в умовах зазначених вище величин рН і/або температури середовища.

Молочна кислота, що виробляється згідно з даним винаходом, може використовуватися для одержання лактиду, циклічного ангідриду двох молекул молочної кислоти. Залежно від стереоізомеру

молочної кислоти таким лактидом може бути D-лактид (утворений з двох молекул D-молочної кислоти), L-лактид (утворений з двох молекул L-молочної кислоти) або D-L-лактид (утворений із однієї L-молекули і однієї D-молекули молочної кислоти). Підходящим способом одержання лактиду із молочної кислоти є метод полімеризації-деполімеризації, описаний у патенті США 5,142,023 Грабера зі співроб. (Gruber et al.).

Лактид, у свою чергу, може частково використовуватися як мономер для одержання полілактидних полімерів (PLA) і співполімерів. Процес виготовлення таких полімерів також описаний у патенті США 5,142,023 Грабера зі співроб. (Gruber et al.). Кращими PLA-продуктами є стійкі щодо плавлення полімери, описані в патенті США 5,338,822 (Gruber et al.). PLA-матеріали можуть бути напівкристалічними або аморфними.

Наведені нижче приклади служать для ілюстрації деяких варіантів практичного здійснення винаходу і жодною мірою не обмежують його об'єму та ідеї. Якщо не зазначено іншого, то всі використовувані тут співвідношення в частинах або відсотках виражені в одиницях маси.

#### Приклад 1

Інокуляційний штам генетично модифікованих дріжджових клітин, позначений як CD 587, був приготований у 250мл шейк-колбі, що містила 100мл  $\text{CaCO}_3$ -буферизованого (42г/л) дріжджовий екстракт (10г/л) - пептонового (20г/л) середовища з 100г/л глюкози. При  $\text{OD}_{600} = 10$  клітини збиралися шляхом центрифугування і після цього повторно суспендувалися в 15% (мас/об.) розчину гліцерину і зберігалися в 1,5мл аликвотах при температурі  $-80^\circ\text{C}$ .

Клітиною CD 587 є клітина K. Marxianus, у котрій PDC-ген делетований, а в її геном на місце делетованого PDC-гена вбудований екзогенний D-LDH-ген L. helveticus під керуванням нативних промоторних і термінаторних послідовностей PDC. Клітина CD 587 та її одержання докладно описані в попередній заявці США №60/384,333 від 30 травня 2002 р.

Фаза росту розпочинається інокуляцією 3л бродильного чана 1,5мл вихідним гліцериновим розчином, що дає початкову  $\text{OD}_{600}$  0,05. Фазу росту проводять в аеробних умовах при безперервному барботуванні повітрям з витратою 1,5л/хв. (0,5об./об./хв.) при безперервному перемішуванні зі швидкістю 800об./хв. Ріст триває доти, поки DO не знижується до 5% від рівня насиченості повітрям. Це збігається з постійною концентрацією  $\text{CO}_2$  у газі на виході. Величину OUR виміряють під час моніторингу кількості введеного повітря й аналізу газів на виході на кисень методом мас-спектрометрії. Під час фази росту величина OUR складає  $20,8 \pm 2,5$  ммоль  $\text{O}_2/\text{г}$  с.м./год. У цих умовах OUR обмежується здатністю клітини метаболічно перетворювати доступний кисень. Кінцева густина клітин становить, приблизно, 4г/л.

Коли DO досягає нуля, умови аерації підтримуються протягом 1 год. до початку виробничої фази. Виробничу фазу розпочинають швидким переключенням витрати потоку повітря на 0,1л/хв. (0,033об./об./хв.) і зменшення швидкості перемішування до 500об./хв. Ця зміна умов аерації приводить до встановлення величини OUR на рівень  $1,5 \pm 0,1$  ммоль  $\text{O}_2/\text{г}$  с.м./год. і DO на нульовий рівень протягом виробничої фази. Ферментація триває приблизно 60 годин. При цьому періодично, шляхом відбирання зразків для аналізу методами HPLC/IC/GC-MS, проводять вимірювання швидкості споживання глюкози, вироблення лактату і виходу лактату. Отримані при здійсненні такого процесу результати виробничої фази наведені в Табл. 1.

Таблиця 1

Максимальний титр молочної кислоти	$106 \pm 3,1$ г/кг
Швидкість споживання глюкози	$1,2 \pm 0,05$ г/г. с.м./год.
Швидкість вироблення молочної кислоти	$1,1 \pm 0,04$ г/г. с.м./год.
Вихід молочної кислоти (виробнича фаза)	$0,92 \pm 0,03$ г молочної кислоти/г глюкози
% відновленого вуглецю (виробнича фаза)	$99\% \pm 3,0\%$
Оптична чистота молочної кислоти	$>99,9$

Описаний експеримент був проведений декілька разів у різних умовах аерації у виробничу фазу, що давали величини OUR, приблизно, 1,2, 2,2, 2,8, 3,0 і 3,2. Отримані результати подані у графічному вигляді на Фіг.1. Як можна бачити на Фіг.1, вихід продукту (крива 1) монотонно знижується з ростом OUR від 1,2 до 3,0 і наприкінці цього діапазону різко зростає (можливо аномально) і далі, при OUR 3,2 знову різко падає. Це зниження виходу продукту добре узгоджується зі зростанням дихання клітин при збільшенні доступного кисню. Швидкість вироблення лактату (крива 3) невеликою мірою зростає в діапазоні величин OUR від 1,2 до 2,2, після чого знижується з подальшим зростанням OUR до 2,8 і далі зростає. Проте, вигравш від зростання швидкості вироблення продукту при величинах OUR 3 і більше втрачається внаслідок втрати при цьому виходу продукту. Швидкість використання глюкози (крива 2) деякою мірою зростає при збільшенні від 1,2 до 2,8 і суттєво зростає при OUR більше 3,0 внаслідок швидкого дихання клітин. Дані, наведені на Фіг.2, свідчать про те, що для використовуваного в цих дослідях штаму оптимальна величина OUR лежить у межах, приблизно, від 0,8 до 2,2 і, головним чином, в межах від 1,0 до 1,5.

## Приклад 2

Експеримент згідно з Прикладом 1 був повторений декілька разів на штамі CD 558. Штамом CD 558 є клітина K. Marxianus з делетованим PDC-геном. Вона містить екзогенний L-LDH-ген L. helveticus, випадковим чином інтегрований у її геном. LDH-ген перебуває під контролем послідовностей PGK-1 промотора S. cerevisiae і Gal-10 термінатора S. cerevisiae. В усіх дослідках величина OUR у фазу росту становила, приблизно, 20,5ммоль O<sub>2</sub>/г с.м./год. Умови аерації під час виробничих фаз змінювалися від дослідку до дослідку шляхом регулювання швидкості барботування і перемішування з метою варіювання величини OUR. Величини OUR у різних дослідках становили 0,6, 1,4, 1,7 і 2,2. У Табл. 2 подані результати, отримані у виробничу фазу з величиною OUR = 1,7.

Таблиця 2

Максимальний титр молочної кислоти	111г/кг
Швидкість споживання глюкози	0,94г/г. с.м./год.
Швидкість вироблення молочної кислоти	0,83г/г. с.м./год.
Вихід молочної кислоти (виробнича фаза)	0,89г молочної кислоти/г глюкози
% відновленого вуглецю (виробнича фаза)	95,6
Оптична чистота молочної кислоти	>99,9

На Фіг.2 можна бачити, як зміна OUR впливає на швидкість вироблення і вихід продукту. Для даного штаму вихід молочної кислоти (крива 1) вказує дуже сильну залежність від величини OUR на ділянці від 0,7 до 2,2, досягаючи максимуму при значеннях OUR навколо 1,4. Швидкість вироблення лактату (крива 1) подібним чином виходить на піковий рівень при зазначеній величині OUR. Швидкість споживання глюкози (крива 2) зростає до OUR приблизно 2,2, після чого виходить на сплюснену ділянку. Одержані з даним штамом результати експерименту свідчать про те, що оптимальні значення OUR лежать у діапазоні, приблизно, від 1 до 1,7, а точніше - від 1,2 до 1,5.

## Приклад 3

Експеримент згідно з Прикладом 1 був проведений три рази. Перший з цих дослідів (3А) був проведений так, як описано в Прикладі 1, за винятком того, що величина OUR під час виробничої фази складала 2,1ммоль O<sub>2</sub>/г. с.м./год. Під час другого з цих дослідів (3В) культура була переключена на виробничу фазу одразу ж, коли DO у фазу росту досягла нуля. Величина OUR складала 1,8ммоль O<sub>2</sub>/г. с.м./год. у тих самих умовах аерації, що й у Прикладі 3А. У третьому досліді (3С) аерацію продовжували і по закінченню фази росту протягом ще 1,5 години після досягнення DO нульового рівня, а величина OUR у виробничу фазу становила 1,4ммоль O<sub>2</sub>/г. с.м./год. у таких самих умовах аерації, що й у Прикладі 3А. Отримані результати підсумовані в Табл. 3.

Таблиця 3

Властивості	Приклад №		
	3А	3В	3С
Час витримування при нульовій DO	1 год.	0	>1,5 год.
OUR у виробничу фазу, ммоль O <sub>2</sub> /г. с.м./год.	2,1	1,8	1,4
Максимальний титр молочної кислоти, г/кг	112,3	84	94
Швидкість споживання глюкози, г/г. с.м./год.	1,22	1,06	0,40
Швидкість вироблення лактату, г/г. с.м./год.	1,20	0,93	0,32
Вихід молочної кислоти, виробнича фаза, г/г	0,89	0,84	0,79
% відновленого вуглецю, виробнича фаза	105	104,3	98
Оптична чистота, %	>99,9	>99,9	>99,9

У даних умовах аерації під час виробничої фази величина OUR служила індикатором метаболічної активності мікроорганізму. Зниження OUR у тих випадках, коли час витримування дорівнював нулю або перевищував 1,5 год., (відносно того, що мало місце після 1 год. витримування) вказує на те, що мікроорганізм працював у цих умовах трохи гірше. Ця обставина відбивається також у зниженні споживання глюкози, продукування лактату і виходу продукту.

## Приклад 4

Інокуляційний штам дріжджової клітини CD 587 культивували в аеробних умовах у 14л лабораторному бродильному чані з буферним (рН 5,5) мінеральним середовищем, доповненим 160г/л глюкози. Аерація здійснювалася барботуванням повітря з витратою 5л/хв. при перемішуванні. Концентрація DO протягом цієї початкової фази росту складала спочатку 100% і знизилася до 20% протягом цього циклу. Величина OUR підтримувалася на рівні, приблизно, 20ммоль O<sub>2</sub>/г. с.м./год. Коли величина OD<sub>600</sub> досягла 10,4 літри

ферментаційного бульйону перенесли у 240л промисловий бродильний чан, що містив ще 220л культурального середовища, доповненого 170г/л глюкози. У цьому чані клітини вирощувалися далі в аеробних умовах при температурі 42°C і рН 5,5 протягом, приблизно, 8 год. На протязі цього часу кількість DO знизилася від початкового рівня до нуля. Величина OUR підтримувалася на рівні 20ммоль  $O_2$ /г. с.м./год. шляхом аерації з витратою повітря 15л/хв. Культуру витримували з нульовою DO протягом 1 години. Після цього вона була переключена на виробничу фазу зниження аерації, внаслідок чого величина OUR встановилася на рівні 1,5-1,7ммоль  $O_2$ /г. с.м./год. Для підтримання рН на рівні  $5,5 \pm 0,1$  був доданий додатковий буферний агент  $Ca(OH)_2$ . Під час виробничої фази кількість розчиненого кисню (DO) залишалася на рівні 0%. Споживання глюкози тривало 30 годин, що дало титр лактату 114г/кг. Середня питома швидкість споживання глюкози протягом виробничої фази становила 1,1г/г. с.м./год. Середня питома швидкість вироблення молочної кислоти складала 0,8г/г. с.м./год. при виході продукту 0,76г молочної кислоти на грам глюкози і загальному виході (включаючи фазу росту) 0,67г молочної кислоти на грам глюкози.

Fig.1

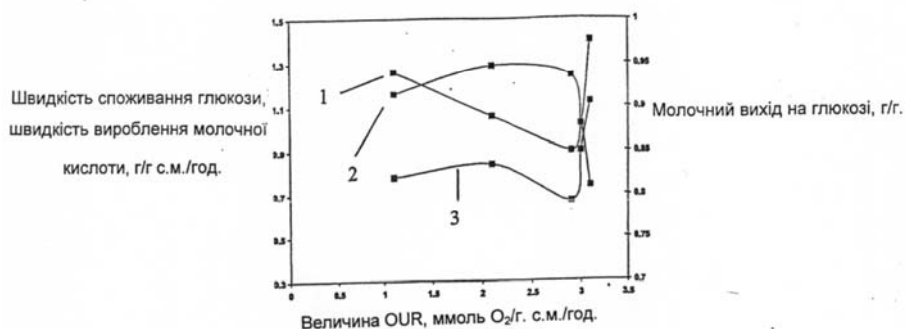


Fig.2

