



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **121025**

(13) **C2**

(51) МПК

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/22 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

C12R 1/38 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

C12R 1/66 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2016 05491</p> <p>(22) Дата подання заявки: 11.12.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.03.2020</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 13196743.2</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 11.12.2013</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 12.09.2016, Бюл.№ 17</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2020, Бюл.№ 6</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ РСТ/EP2014/077462, 11.12.2014</p>	<p>(72) Винахідник(и): Вайнію Хейді (FI), Сіппонен Міка (FI), Лааксо Сімо (FI), Пастінен Оссі (FI), Лехтомякі Ілкка (FI), Коскінен Пертту (FI), Лааманен Мія (FI)</p> <p>(73) Власник(и): НЕСТЕ ОЙ, Keilaranta 21, FIN-02150 Espoo, Finland (FI)</p> <p>(74) Представник: Дубинський Михайло Ілліч, реєстр. №70</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2013006755 A2, 10.01.2013 WO 2008151149 A2, 28.09. 2004 EP 2468857 A1, 27.06.2012 EP 2468877 A1, 27.06.2012 US 2011252696 A1, 20.10.2011 Zhenhua Ruan et al: "Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by Mortierella isabellina for biodiesel production", Bioresource Technology, vol. 110, 01.04.2012, P. 198-205</p>
--	---

(54) СПОСІБ ВИРОБНИЦТВА ОДНОКЛІТИННОЇ ОЛІЇ З ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНИХ МАТЕРІАЛІВ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу одержання мікробних ліпідів з застосуванням інгібіторів, які одержують з лігноцелюлозних матеріалів, для стримування проліферації небажаних мікроорганізмів у ферментативному бульйоні.

UA 121025 C2

Галузь винаходу

Даний винахід стосується способів виробництва мікробних ліпідів. Зокрема, даний винахід стосується способів виробництва мікробних ліпідів з застосуванням інгібіторів, які одержують із лігноцелюлозних матеріалів, для стримування проліферації небажаних мікроорганізмів у ферментативному бульйоні.

Рівень техніки

Лігноцелюлоза є найпоширенішим біополімером на землі. Лігноцелюлоза є головним структурним компонентом деревних рослин та недеревних рослин, таких, як трава. Лігноцелюлозна біомаса означає рослинну біомасу, яка складається з целюлози, геміцелюлози та лігніну. Велика кількість лігноцелюлозних залишків продукується у галузях лісівництва, деревообробки та целюлозно-паперовій промисловості та в сільському господарстві (солома, сухі корми, жом, висівки) і багатьох галузях агропромислового комплексу. Крім того, муніципальні відходи містять фракції, які можуть розглядатись як лігноцелюлозні залишки, такі, як відходи паперу або картону, садові відходи або відходи деревини від будівництва. Завдяки великій кількості та низьким цінам, лігноцелюлозні залишки є оптимальними матеріалами для виробництва біопалива. Крім того, спеціальні деревні або трав'янисті енергетичні культури з продуктивністю біомаси викликають інтерес з точки зору використання біопалива.

Виробництво біопалива, зокрема, етанолу, з лігноцелюлозних матеріалів шляхом мікробної ферментації широко досліджується. Найбільша проблема для використання лігноцелюлоз для мікробіологічного виробництва біопалива або сировини для біопалива полягає у складності лігноцелюлозного матеріалу та його стійкості до біодеградації. У лігноцелюлозі волокна целюлози (20-50 % сухої маси рослини) є включеними у ковалентно зв'язану матрицю геміцелюлози (20-40 %), пектину (2 – 20 %) та лігніну (10 – 20 %), що утворює дуже стійку для біодеградації структуру. Крім того, цукрові залишки геміцелюлози містять регульовану суміш гексоз (наприклад, глюкози, манози та галактози) та пентоз (наприклад, арабінози та ксилози), залежно від біомаси.

Попередня переробка лігноцелюлозного матеріалу з високим виходом цукрів, які можуть використовуватися мікроорганізмами, являє собою одну з найбільших проблем. Потрібні значні скорочення витрат на ферменти, які вимагаються для гідролізу цукрових полімерів до цукрових мономерів, які можуть використовуватися потрібними мікроорганізмами. Крім того, економічно обґрунтоване виробництво біопалива з лігноцелюлозних матеріалів вимагає ефективного перетворення всіх головних вуглеводних складових цього комплексного матеріалу на біопаливо.

Ферментативний гідроліз лігноцелюлозного матеріалу зазвичай здійснюють окремим етапом з процесу виробництва біопалива з застосуванням ферментів промислового виробництва, придбаних і вироблених поза фактичним процесом виробництва біопалива.

Певні мікроорганізми можуть виробляти ліпіди з органічних молекул, таких, як цукри, які походять від лігноцелюлози. Деякі мікроорганізми, як правило, дріжджі, грибки або бактерії, можуть ефективно перетворювати С6 та С5 цукри у лігноцелюлозних матеріалах на олію. Олію, що виробляється гетеротрофними мікроорганізмами, часто називають одноклітинною олією або мікробною олією. Процес вироблення одноклітинної олії з застосуванням гетеротрофних мікроорганізмів включає культивування мікроорганізмів в аерованих біореакторах, забезпечення накопичення клітинами ліпідів, збирання багатих на ліпіди клітин та видобування олії з клітин. Ліпіди на основі мікроорганізмів (тобто, одноклітинні олії) застосовують як сировину для виробництва біопалива, такого, як біодизель, відновлюване дизельне паливо або біологічне реактивне паливо.

Гідролізати лігноцелюлози також застосовують у виробництві одноклітинних олій. Гідроліз лігноцелюлози зазвичай здійснюють шляхом попередньої переробки лігноцелюлозного матеріалу на мономерні цукри, які подаються на біопроект.

У патентній публікації US2009217569 описується вироблення одноклітинної олії з різних лігноцелюлозних гідролізатів та гідролізатів з інших матеріалів, таких, як солома, деревина, залишки целюлозної та паперової промисловості, волокна вторинної переробки, муніципальні відходи, водоростева біомаса. Виробництво біопалива включає обробку вихідного матеріалу водою, кислотою або лугом і приведення фільтрату або осаду у контакт з продукуючим ліпіди мікроорганізмом. У патентній публікації US2009064567 описується вироблення одноклітинної олії з гідролізатів целюлозного матеріалу для вироблення біодизеля та реактивного біопалива страменопілами. У документі US20090011480 описується вироблення одноклітинної олії гетеротрофно вирощуваними водоростями та грибами з деполімеризованих лігноцелюлозних матеріалів, таких, як солома, деревина, відходи целюлозного виробництва, просо. У документі CN101148630 описується виробництво одноклітинної олії з гідролізатів геміцелюлози

пшеничної, кукурудзяної або рисової соломи, яку одержують шляхом парового вибуху, з використанням бактерій або грибків.

Крім того, у джерелах існуючого рівня техніки описується вироблення ліпідів безпосередньо з полімерних цукрів у лігноцелюлозі, такий, як ксилан, як описано у публікації Fall et al. (1984), або у целюлозі, як описано у публікації Lin et al. (2010).

У документі WO2010042842 описується вироблення одноклітинної олії з гідролізатів лігноцелюлози змішаною культурою мікроорганізму(ів), здатного(их) розщеплювати полімерні цукри у лігноцелюлозі та принаймні одного виду водоростей. Культуру вирощують, послідовно культивуючи в аеробних та анаеробних умовах, при яких продукуються жирні кислоти з полімерних цукрів та з продуктів анаеробної ферментації.

У документі WO201006228 описується послідовне виробництво біопалива з лігноцелюлоз. На першому етапі відбувається анаеробна ферментація організмами, здатними виробляти спирти з полімерних цукрів гідролізатах лігноцелюлози, а на другому етапі використане культуральне середовище, яке може містити принаймні один продукт ферментації, обробляють водоростями з метою накопичення одноклітинних олій.

Присутність забруднюючих не продукуючих ліпідів мікробів у ферментативному бульйоні може впливати на продуктивність та вихід олії, оскільки не продукуючий ліпід мікроб конкурує з продукуючими олію мікроорганізмами (оліїстими мікробами) за цукри у гідролізатах лігноцелюлози, а отже, робить процес менш здійсненним.

Таким чином, існує потреба у способі регулювання культивування мікроорганізмів у процесі виробництва одноклітинної олії, таким чином, щоб проліферація оліїстих мікробів переважала над проліферацією неоліїстих мікробів.

Короткий опис винаходу

Вироблення одноклітинної олії зазвичай здійснюється шляхом культивування продукуючих ліпідів мікробів (оліїстих мікробів) в аеробних умовах у присутності придатного субстрату, такого, як лігноцелюлозні цукри, такі, як геміцелюлозні цукри, які одержують шляхом фракціонування лігноцелюлози. Середній аеробний біореактор зазвичай має значно менший об'єм та продуктивність порівняно з анаеробними біореакторами і функціонує з більшими витратами. Звідси випливає, що потреби в ефективному культивуванні для виробництва одноклітинної олії є вищими, ніж при покладанні на культивування в аеробних умовах. Забруднення культивування мікробами, які не продукують ліпідів, або продукують лише у малій кількості, може значною мірою знизити вихід та продуктивність одноклітинної олії. Таким чином, слід уникати присутності забруднюючих мікробів під час культивування.

Отже, одна мета даного винаходу полягає у забезпеченні способу виробництва одноклітинної олії, який дозволяє вичерпувати або знижувати кількість забруднюючих не продукуючих ліпідів мікробів у культурі, а отже, сприяє проліферації оліїстих мікробів.

Фракціонування лігноцелюлози зазвичай утворює фракцію геміцелюлози, яка містить високу концентрацію інгібуючих сполук, як правило, фенольних сполук. У виробництві одноклітинної олії зазвичай вимагаються висококонцентровані цукрові розчини (сиropи). Таким чином, гідролізати геміцелюлози потребують концентрації. Нелеткі інгібітори концентрують у гідролізаті, тоді як рідину концентрують шляхом випарювання.

У процесі фракціонування лігноцелюлози утворюються продукти розпаду. Деякі з цих продуктів розпаду діють як мікробні інгібітори (такі, як фенольні сполуки, органічні кислоти, фурфурол та гідроксиметилфурфурол). Авторами винаходу було виявлено, що шляхом регулювання концентрації цих мікробних інгібіторів залежно від толерантності оліїстих мікробів до зазначеного інгібітора може пригнічуватися проліферація забруднюючих не продукуючих ліпідів мікробів.

Відповідно, перший аспект даного винаходу стосується способу виробництва ліпідів, який включає такі етапи

(i) забезпечення середовища для культивування, яке включає лігноцелюлозний гідролізат, (ii) забезпечення ферментативного бульйону шляхом інокуляції середовища для культивування (i) першим мікробом, причому вищезгаданий перший мікроб є оліїстим мікробом, (iii) інкубацію вищезгаданого середовища, інокульованого вищезгаданим першим мікробом, що забезпечує можливість накопичення ліпідів,

причому вищезгаданий ферментативний бульйон включає принаймні один інгібітор росту мікробів, і вищезгаданий перший мікроб є толерантним до вищезгаданого(их) інгібітора(ів) росту мікробів, причому вищезгадану інкубацію здійснюють в аеробних умовах.

Другий аспект даного винаходу стосується ферментативного бульйону, який включає лігноцелюлозний гідролізат, принаймні один інгібітор росту мікробів та оліїстий мікроб, причому вищезгаданий оліїстий мікроб є толерантним до вищезгаданого(их) інгібітора(ів) росту мікробів.

Третій аспект стосується застосування ферментативного бульйону згідно з даним винаходом у способі виробництва ліпиду.

Четвертий аспект стосується застосування композиції, яка включає принаймні один інгібітор росту мікробів, у способі виробництва ліпиду, причому ліпід продукується й накопичується в олійстому мікробі, і вищезгаданий олійстий мікроб є толерантним до вищезгаданого принаймні одного інгібітора росту мікробів.

Короткий опис фігур

Фігура 1 представляє показники (суха маса клітин (CDW) (г/л), концентрація жирної кислоти (FA)(г/л), безжирова суха маса клітин (CDW) (г/л) та вміст (%) жирної кислоти (FA) у мікробній біомасі) підживлювальної ферментації з *Aspergillus oryzae* на гідролізатах целюлози та геміцелюлози пшеничної соломи.

Фігура 2 представляє вихід твердого залишку від аутогідролізу пшеничної соломи.

Фігура 3 представляє концентрацію загальної розчинної цукру (г/л, ліва вісь у) та потенційних мікробних інгібіторних речовин; фурфуролу, гідроксиметилфурфуролу (HMF) та розчинних фенолів (г/л, права вісь у) у рідкій фракції, одержаній від аутогідролізу пшеничної соломи при консистенції 10 % (г сухої твердої речовини соломи / г загальної маси).

Детальний опис винаходу

В описі варіантів втілення винаходу для зрозумілості вживається спеціальна термінологія. Однак винахід не обмежується вибраними таким чином спеціальними термінами, і слід розуміти, що кожен конкретний термін охоплює всі технічні еквіваленти, які функціонують у подібний спосіб для досягнення подібної мети.

Цей винахід стосується використання (лігно)целюлозних матеріалів як сировини для виробництва одноклітинних олій. Вироблена одноклітинна олія може бути застосована як сировина для виробництва біопалива, такого, як біодизель, відновлюване дизельне паливо або реактивне паливо.

Визначення

Інгібітор росту мікробів

У контексті даного винаходу термін "мікробний інгібітор" або "інгібіторна сполука" вказуються як сполуки, які походять від лігноцелюлозного матеріалу, тобто, продукти розпаду лігноцелюлози, які можуть інгібувати ріст мікроорганізмів. Такі сполуки зазвичай утворюються при фракціонуванні лігноцелюлози, коли виробляються лігноцелюлозні цукри. До таких сполук, крім інших, належать фенольні сполуки (такі, як 4-гідроксibenзойна кислота, р-кумарова кислота, ванілінова кислота, ванілін, фенол, гваякол, гідрохінон, катехол, ферулова кислота, сирінгальдегід, бузкова кислота), фурфурол, гідроксиметилфурфурол (HMF), органічні кислоти (оцтова кислота, мурашина кислота та левулінова кислота) та екстрактивні речовини (капроєва кислота, каприлова кислота, пальмітинова кислота та пеларгонова кислота). Ефекти інгібування росту, які забезпечуються цими сполуками, можуть залежати від мікроорганізму та від умов культивування. Якщо інгібіторні сполуки трапляються у сумішах, вони можуть мати сукупний ефект, тобто, інгібувати ріст мікробів у концентраціях, нижчих ніж без присутності іншої(их) інгібіторної(их) сполуки (сполук).

У контексті даного винаходу вуглевод з лігноцелюлозної біомаси не охоплюється визначенням мікробного інгібітора.

"Оптимізований рівень інгібіторів ферментації" - цей термін стосується концентрації інгібіторних сполук, яка забезпечує можливість росту та продукування ліпідів олійстими мікроорганізмами, але інгібує ріст забруднюючих неолійстих мікроорганізмів.

Ароматичні сполуки, фенольні сполуки

Ароматичний вуглеводень означає сполуку, яка має кільцеву структуру, утворену ковалентними зв'язками між атомами вуглецю, яка містить переміжні кон'юговані подвійні та одинарні зв'язки у кільцевій структурі. Ароматичний вуглеводень також може означати сполуку, яка має кільцеву структуру, утворену ковалентними зв'язками між атомами вуглецю та відмінними від вуглецю атомами, яка містить переміжні кон'юговані подвійні та одинарні зв'язки у кільцевій структурі.

Термін "фенольна сполука" означає сполуку, яка включає принаймні одну ароматичну вуглеводневу групу, що містить принаймні одну гідроксильну групу (-OH), прямо зв'язану з ароматичною вуглеводневою групою. У цій заявці концентрацію фенольної сполуки вимірювали шляхом колориметричного аналізу згідно зі способом Фоліна-Чокальтеу (Waterhouse, 2002). До таких сполук належать, крім інших, фенольні сполуки, такі, як р-кумариловий спирт, коніфероловий спирт, синапіловий спирт, 4-гідроксіацетофенон, ацетованілон, ацетосирингон, 4-гідроксibenзальдегід, ванілін, сирінгальдегід, 4-гідроксibenзойна кислота, ванілінова кислота, бузкова кислота, р-кумарова кислота, ферулова кислота, синапова кислота, фенол, гваякол,

сирингол, гідрохінон, катехол, 2-метилфенол, 3-метилфенол, 4-метилфенол, 2,6-диметилфенол, 2,4-диметилфенол, 4-етилфенол, 3,4-дигідроксибензальдегід, 4-метилгваякол, 4-вінілфенол, 4-етил-2-метилфенол, 4-алілфенол, 3-метоксикатехол, 2,6-диметокси-4-метилфенол, ваніліновий спирт, гомованілін, гомованілінова кислота, 1-(4-гідрокси-3-метоксифеніл)етанол, 1-(4-гідрокси-3-метоксифеніл)ален, метиловий естер ванілінової кислоти, 4-етил-2,6-диметоксифенол, 4-метилкатехол, 4-етилгваякол, 4-пропілфенол, 4-вінілгваякол, 4-гідроксибензиловий спирт, 3-гідрокси-2-метил-(4Н)-піран-4-он, 3,5-дигідрокси-2-метил-(4Н)-піран-4-он, 4-пропенілфенол, 2,6-диметокси-4-пропілфенол, дигідроконіфериловий спирт, гомосирінгальдегід, 3,5-диметокси-4-гідроксибензиловий спирт, 2,6-диметокси-4-пропенілфенол, 1-(3,5-диметокси-4-гідроксифеніл)етанол, коніфериловий альдегід, сирингілацетон, метиловий естер бузкової кислоти, пропіосирингон, сирингілвінілкетон, дигідросинапіловий спирт, синапальдегід, 2,6-диметоксифенол, 1-(4-гідроксифеніл)етанол, евгенол, 5-етилпірогалол, 4-пропілгваякол, 1,4-дигідрокси-3-метоксибензол, ізоевгенол, метиловий естер 4-гідроксибензойної кислоти, гваяцилацетон, 2,6-диметокси-4-вінілфенол, пропіованілон, гваяцилвінілкетон, 4-аліл-2,6-диметоксифенол, включаючи всі їхні можливі ізомери, олігомерний та/або полімерний лігнін, таніни, поліфеноли, суміші фенольних сполук, ковалентно зв'язані сполуки, які включають нефенольні сполуки та фенольні сполуки.

Термін "концентрація фенольних сполук" означає концентрацію сполук (зазвичай виражається у г/л) у водному розчині, яку вимірюють згідно зі способом Фоліна-Чокальтеу (Waterhouse, 2002).

Лігноцелюлозний матеріал

Терміни "лігноцелюлозна біомаса" або "лігноцелюлозний матеріал" охоплюють, крім інших, деревні рослини або недеревні, трав'янисті рослини або інші матеріали, які містять целюлозу та/або геміцелюлозу: матеріали можуть являти собою сільськогосподарські залишки (такі, як пшенична солома, рисова солома, висівки, лушпиння, кукурудзяна солома, жом цукрової тростини, верхівки та листя цукрової тростини), спеціальні енергетичні культури (такі, як просо, *Miscanthus*, *Arundo donax*, очеретянка звичайна, верба, водяний гіацинт, енергетична тростина, енергетичне сорго), деревні матеріали або залишки (включаючи залишки або уламки з пилорам та целюлозних та/або паперових фабрик, такі, як геміцелюлоза, сульфит-спиртова барда, відходи волокон та/або первинний шлам), мох або торф, або міські паперові відходи. Термін "лігноцелюлозний матеріал" також включає низьколігнінові матеріали, такі матеріали, як макроводоростева біомаса. Крім того, матеріали також включають геміцелюлозу або фракції целюлози від промислових процесів. Термін "лігноцелюлозний матеріал" охоплює будь-який тип фракції целюлози. Сировину або певні фракції сировини різного походження, різних видів рослин або від різних промислових процесів, такі, як геміцелюлоза та/або целюлоза, змішують і застосовують як сировину для культивування біомаса мікроорганізмів згідно з цим винаходом. Зазвичай вміст лігніну в лігноцелюлозі є вищим за 5 %. Лігноцелюлозна біомаса також може містити крохмаль, наприклад, у разі цілих рослин

Гідроліз

Термін "гідроліз" у даному разі стосується деполімеризації шляхом додавання води у глікозидні зв'язки або естерні зв'язки немономерних вуглеводів до цукрових олігомерів та мономерів або карбонових кислот.

Гідролізат

Терміни "гідролізат" або "гідролізований матеріал" стосується матеріалу, який було піддано гідролізові.

Гідролізат лігноцелюлози

Термін "гідролізат лігноцелюлози" стосується продуктів гідролізу лігноцелюлози або лігноцелюлозного матеріалу, які включають целюлозу та/або геміцелюлозу, олігосахариди, моно- та/або дисахариди, оцтову кислоту, мурашину кислоту, інші органічні кислоти, фурфурол, гідроксиметилфурфурол, левулінову кислоту, фенольні сполуки, інші продукти гідролізу та/або розпаду, утворені з лігніну, целюлози, геміцелюлози та/або інших компонентів лігноцелюлози, азотні сполуки, що походять з білків, металів, та/або негідролізовані або частково гідролізовані фрагменти лігноцелюлози.

Гідротермічна обробка

У контексті даного винаходу термін "гідротермічна обробка" стосується обробки водної суспензії лігноцелюлози при температурах понад 50 °C. Гідротермічну обробку здійснюють під тиском у реакторі високого тиску або при атмосферному тиску у реакторі не під тиском. Тиск у реакторі високого тиску може створюватися паром, отриманою від води при нагріванні до точки кипіння або шляхом додавання газової фази під тиском. Гідротермічну обробку здійснюють у присутності каталізатора або за відсутності каталізатора. Гідротермічну обробку за відсутності

каталізатора (також називається "аутогідролізом" або "АН") здійснюють для гідролізу лігноцелюлозної біомаси без додавання каталізатора, коли водну суспензію лігноцелюлозної біомаси піддають гідротермічній обробці при температурах, які перевищують 120 °С, під тиском.

"Аутогідролізована солома" означає тверду фракцію, яку було одержано після аутогідролізу.

5 Аутогідролізована солома може бути піддана промиванню.

Паровий вибух

У контексті даного винаходу термін "парового вибуху" стосується обробки, при якій матеріал нагрівають парою під високим тиском (при температурах від 110 °С до 250 °С, зазвичай 140-230 °С) під тиском з додаванням або без додавання хімікатів (таких, як кислоти) і матеріал тримають при температурі протягом певного часу, після чого тиск ослаблюють, що викликає вибухову декомпресію матеріалу. У цьому контексті паровий вибух застосовують до лігноцелюлозних матеріалів, і він зазвичай веде до розриву жорсткої структури лігноцелюлозних волокон, тобто, дефібриляції пучків целюлозних волокон.

Делігніфікаційна обробка

15 "Делігніфікаційна обробка" означає обробку, яка видаляє неуглеводний матеріал, такий, як лігнін, з лігноцелюлозної біомаси. Делігніфікаційна обробка також означає обробку, яка видаляє неуглеводний та углеводний матеріал як суміш з лігноцелюлозної біомаси.

Лужний агент делігніфікації

20 У контексті даного винаходу термін "лужний агент делігніфікації" означає хімічну сполуку або суміш хімічних сполук, які при додаванні до води дають розчини з активністю іонів водню, нижчою, ніж у чистої води, тобто, з показником рН, вищим за 7,0. Лужний агент делігніфікації може бути вибраним з групи сполук, яка включає, крім інших, гідроксиди, такі, як LiOH (гідроксид літію), NaOH (гідроксид натрію), KOH (гідроксид калію), Ca(OH)₂ (гідроксид кальцію), NH₄OH (гідроксид амонію), або сполук, які можуть утворювати іони гідроксидів у воді, таких, як NH₃ (аміак) у рідкому або газоподібному стані, карбонати, такі, як HCO₃⁻ (іон бікарбонату), Li₂CO₃ (карбонат літію), Na₂CO₃ (карбонат натрію), K₂CO₃ (карбонат калію), сульфідиди, такі, як Na₂S (сульфід натрію) та відповідні гідрати.

Ферментний гідроліз

30 У контексті даного винаходу термін "ферментний гідроліз" стосується ферментної обробки лігноцелюлозного матеріалу, який включає целюлозу та/або геміцелюлозу та олігосахариди, при якій ферменти сприяють гідролізові целюлози та/або геміцелюлози та олігосахаридів для одержання моно- та/або дисахаридів. Зазвичай ферментний гідроліз лігноцелюлозного матеріалу здійснюють шляхом піддавання лігноцелюлозного матеріалу дії суміші ферментів у присутності води або буфера. Суміш ферментів зазвичай складається, крім іншого, з 1,4-3-глюканаз (ендоглюканаз та екзоглюканаз або ендоцелюлаз та екзоцелюлаз), 1,4-3-глюкозидаз (целобіаз) та ферментів, які розщеплюють геміцелюлозу (геміцелюлаз, ксиланаз, арабіназ і т. ін.).

Фракція лігноцелюлозної біомаси

40 "Фракція лігноцелюлозної" біомаси стосується будь-якої фракції, яка походить з лігноцелюлозної біомаси і, таким чином, може не містити лігніну.

Мікробний ліпід або ліпід

45 У контексті даного винаходу терміни "мікробний ліпід", "ліпід" або "внутрішньоклітинний ліпід" стосуються будь-якої жирної речовини, молекула якої в цілому містить як частину аліфатичний углеводневий ланцюг, яка розчиняється у неполярних органічних розчинниках, але є слабозрозумінною у воді. Ліпіди є незамінною групою великих молекул у живих клітинах. Ліпідами є, наприклад, жири, олії, воски, воскові естери, стерини, терпеноїди, ізопреноїди, каротиноїди, полігідроксіалканоати, нуклеїнові кислоти, жирні кислоти, жирні спирти, жирні альдегіди, естери жирних кислот, фосфоліпіди, гліколіпіди, сфінголіпіди та ацилгліцерини, такі, як триацилгліцерини, діацилгліцерини або моноацилгліцерини.

50 Оптимальними ліпідами згідно з даним винаходом є жири, олії, воски, ацилгліцерини та жирні кислоти та їхні похідні, зокрема, триацилгліцерини та воскові естери. У контексті даного винаходу ліпіди синтезуються мікробами й накопичуються ними (внутрішньоклітинні ліпіди).

У контексті цього винаходу термін "одноклітинна олія" вживається як синонім ліпідів та жиру.

55 Термін "ацилгліцерин" означає естер гліцерину та жирних кислот. Ацилгліцерини трапляються у природі як жири та жирні олії. Прикладами ацилгліцеринів можуть бути триацилгліцерини (TAG, тригліцериди), діацилгліцерини (дигліцериди) та моноацилгліцерини (моногліцериди).

Цукор

60 У контексті даного винаходу термін "цукор" означає олігомерні, димерні та мономерні углеводи. Зокрема, в цій заявці термін "цукор" стосується водорозчинних олігомерних,

димерних та мономерних вуглеводів, які походять від лігноцелюлозних матеріалів. Під терміном "полімерні цукри" слід розуміти вуглеводи, які перебувають у полімерній формі й зазвичай не є розчинними у воді.

Вихід цукру

У контексті даного винаходу термін "вихід цукру" означає вихід олігомерних, димерних та мономерних вуглеводів з конкретних матеріалів. Зокрема, в цій заявці термін "вихід цукру" стосується виходу водо розчинних олігомерних, димерних та мономерних вуглеводів, які походять від лігноцелюлозних матеріалів.

Процес виробництва одноклітинної олії

"Процес виробництва одноклітинної олії" означає процес, який включає етапи утворення або забезпечення можливості росту синтезуючого ліпіди мікроорганізму та забезпечення можливості продукування та/або зберігання (накопичення) ліпиду одержаною таким чином масою організму, видобування клітин з рідкої фази та екстрагування або видобування ліпідів з клітин. У певних випадках одноклітинна олія також може бути позаклітинною, наприклад, виділеною або вивільненою з клітин у культуральному середовищі під час або після культивування.

Аеробне культивування

Термін "аеробне культивування" або "аеробна ферментація" означає культивування, при якому мікроорганізм використовує кисень як кінцевий акцептор електронів для вироблення енергії (тобто, мікроорганізм використовує аеробне дихання). Зазвичай у біореакторах аеробне культивування здійснюють шляхом додавання кисню або газової суміші, яка містить кисень (як правило, повітря), тобто, біореактор аерують. Якщо мікроорганізми використовують аеробне дихання при культивуванні, це називається "культивуванням в аеробних умовах". Зазвичай це відбувається в аерованих біореакторах.

Асептична операція

Термін "асептична операція" означає операцію, при якій системи культивування мікроорганізмів (наприклад, біореактор) піддають стерилізації перед культивуванням, і операцію виконують у спосіб, який дозволяє запобігати забрудненню (тобто, виключає ріст небажаних мікроорганізмів) у системах культивування, наприклад, з застосуванням антимікробних агентів, які не є одержаними від попередньої обробки лігноцелюлози. "Неасептична операція" означає операцію, яку виконують в інший спосіб, ніж "асептичну операцію".

Оліїстий мікроб або продукує олію мікроорганізм

Оліїсті мікроби (також називаються продукує олію організмами), які використовують згідно з даним винаходом, вибирають з групи бактерій, ціанобактерій, грибків, таких, як дріжджі та нитчасті гриби, археї або мікроводорості. Мікроорганізми можуть легко накопичувати ліпіди або бути генетично модифікованими таким чином, щоб накопичувати ліпіди або поліпшувати накопичення ліпідів.

В оптимальному варіанті застосовують організми, здатні використовувати C6 та C5 цукри. В оптимальному варіанті організмами є дріжджі, нитчасті гриби або бактерії.

У контексті даного винаходу оліїстий мікроорганізм (оліїстий мікроб) означає мікроорганізм, здатний накопичувати внутрішньоклітинні ліпіди, таким чином, що ліпіди складають принаймні 15 % (маса/маса) від загальної біомаси (за сухою масою клітин) мікроба при його культивуванні за придатних умов. В оптимальному варіанті втілення оліїстий мікроб здатен накопичувати принаймні 20 % (маса/маса) від загальної біомаси мікроба (за сухою масою клітин).

До оптимальних штамів мікроорганізмів з точки зору даного винаходу належать, крім інших, нижчеперелічені види та роди:

Згідно з одним варіантом втілення винаходу, перший мікроб є оліїстим мікробом, здатним використовувати цукри, взяті з лігноцелюлозних матеріалів. В оптимальному варіанті оліїсті організми є здатними використовувати C6 цукри (цукри з шістьма атомами вуглецю, такі, як глюкоза, маноза та галактоза) та C5 цукри (такі, як ксилоза та арабіноза) у лігноцелюлозних гідролізатах. Згідно з одним варіантом втілення винаходу, оліїстий організм здатен використовувати полімерні або олігомерні вуглеводи у лігноцелюлозі або її фракціях.

Оптимальні (нитчасті) грибові штами належать до видів з родів *Aspergillus*, таких, як *Aspergillus oryzae*, *Mortierella*, таких, як *Mortierella isabellina*, *Chaetomium*, *Claviceps*, *Cladosporidium*, *Cunninghamella*, *Emericella*, *Fusarium*, *Glomus*, *Mucor*, *Pseudozyma*, *Pythium*, *Rhizopus*, таких, як *Rhizopus oryzae*, *Tremella*, *Zygorhynchus*, *Humicola*, *Cladosporium*, *Malbranchea*, *Umbelopsis*, таких, як *Umbelopsis isabellina* та *Ustilago*. Найкращі види грибів належать до родів *Aspergillus* та/або *Mortierella*. Оптимальними грибами є гриби, здатні ефективно продукувати ліпіди.

Оптимальні дріжджові штами належать до видів з родів *Geotrichum*, *Deparyomyces*,

Pachysolen, Galactomyces, Hansenula, Leucosporidium, Sporobolomyces, Sporidiobolus, Waltomyces, Cryptococcus, таких, як Cryptococcus curvatus, Rhodosporidium, таких, як Rhodosporidium toruloides або Rhodosporidium fluviale, Rhodotorula, таких, як Rhodotorula glutinis, Yarrowia, таких, як Yarrowia lipolytica, Candida, таких, як Candida curvata, Lipomyces, таких, як Lipomyces starkeyi та Trichosporon, таких, як Trichosporon cutaneum або Trichosporon pullulans. Найкращими дріжджами є дріжджі з родів Lipomyces, Rhodosporidium та Cryptococcus. Оптимальними дріжджами є дріжджі, здатні ефективно продукувати ліпіди.

Оптимальні бактерії належать до видів з родів Rhodococcus, Acinetobacter та Streptomyces. Оптимальними бактеріями є бактерії, здатні ефективно продукувати ліпіди.

Найкращими водоростями є мікроводорості, такі, як види мікроводоростей з родів, які включають Brachiomonas, Cryptocodinium, Chlorella, Dunaliella, Hantzschia, Nannochloris, Nannochloropsis, Nitzschia, Prototheca, Scenedesmus, Schizochytrium, Traustochytrium та Ulkenia. Оптимальними мікроводоростями є мікроводорості, здатні до гетеротрофного росту та ефективного продукування ліпідів. Організми, які належать до родів Schizochytrium, Thraustochytrium та Cryptocodinium та Ulkenia, іноді називаються морськими водоростями.

Згідно з ще одним варіантом втілення винаходу, вуглеводи з лігноцелюлозної біомаси здебільшого мають мономерну форму, і організми, не здатні використовувати олігомерні або полімерні вуглеводи, використовують для виробництва одноклітинної олії. Такі продукуючі олію організми вибирають з групи бактерій, ціанобактерій, грибів, таких, як дріжджі та нитчасті гриби, археї або мікроводорості. Мікроорганізми можуть легко накопичувати ліпіди або бути генетично модифікованими для накопичення ліпідів або поліпшеного накопичення ліпідів.

Ліпидовмісна одноклітинна маса

"Ліпидовмісна одноклітинна маса" означає одноклітинну масу та клітинний міцелій з вмістом ліпідів, який в оптимальному варіанті складає принаймні 10 %, у ще кращому варіанті – принаймні 15 % (маса/маса) або більше сухого матеріалу біомаси мікроорганізмів.

Видобування ліпідів

"Видобування олії" або "видобування ліпідів" або "видобування ліпиду з оліїстого мікроба" стосується процесу, в якому ліпід (внутрішньоклітинний ліпід) видобувають з клітин мікроорганізмів механічним, хімічним, термомеханічним або аутокаталітичним способами або з застосуванням комбінації цих способів. В альтернативному варіанті "видобування олії" може означати видобування позаклітинно продукованих ліпідів з бульйону для культивування (ферментації).

Залишкова клітинна маса

У контексті даного винаходу "залишкова клітинна маса" означає фракцію твердого, напівтвердого або текучого матеріалу, яка містить мікроорганізми, оброблені для видобування внутрішньоклітинних ліпідів

Біопаливо

У контексті даного винаходу "біопаливо" означає тверде, рідке або газоподібне паливо, яке здебільшого походить від біомаси або біологічних відходів і відрізняється від викопних видів палива, які походять від органічних залишків доісторичних рослин та тварин.

Згідно з директивою ЄС 2003/30/EU, "біодизель" означає метиловий естер, одержаний з рослинної олії або тваринної олії, який має дизельну якість, що дозволяє застосовувати його як біопаливо. У більш широкому сенсі біодизель означає довголанцюгові алкілові естери, такі, як метиловий, етиловий або пропіловий естери, з рослинної олії або тваринної олії дизельної якості. Біодизель також може бути одержаний з ліпідів мікроорганізмів, причому ліпід мікроорганізму може бути взятий з бактерії, грибка (дріжджів або нитчастого гриба), водорості або іншого мікроорганізму.

Відновлюване дизельне паливо

"Відновлюване дизельне паливо" означає паливо, яке одержують шляхом водневої обробки ліпідів тваринного, рослинного або мікроорганічного походження, або їхніх сумішей, причому ліпід мікроорганізму може бути взятий з бактерії, грибка (дріжджів або нитчастих грибів), водорості або іншого мікроорганізму. Відновлюване дизельне паливо також може бути одержане з восків, отриманих з біомаси шляхом газифікації та синтезу Фішера-Тропша. Необов'язково додатково до водневої обробки здійснюють ізомеризацію або інші етапи обробки. Процес одержання відновлюваного дизельного палива також може застосовуватися для виробництва реактивного палива та/або бензину. Виробництво відновлюваного дизельного палива було описано у патентних публікаціях EP 1396531, EP1398364, EP 1741767 та EP1741768.

Біодизель або відновлюване дизельне паливо може змішуватися з викопними видами палива. До паливного продукту можуть додаватися прийнятні домішки, такі, як консерванти та

антиоксиданти.

Масило

"Масило" означає речовину, таку, як консистентне масило, ліпід або олію, що зменшує тертя при нанесенні на поверхню рухомих деталей. Дві інші головні функції мастила полягають у видаленні теплоти та розчиненні забруднювачів. Прикладами застосування мастил, крім інших, є застосування у двигунах внутрішнього згоряння як машинна олія, домішки до палива, в олійних пристроях, таких, як насоси та гідравлічне обладнання, або у різних типах підшипників. Зазвичай мастила містять 75-100 % основної олії, а решту складають домішки. Придатними домішками є, наприклад, детергенти, стабілізатори зберігання, антиоксиданти, інгібітори корозії, освітлювачі, деемульгатори, протиспінювачі, співрозчинники та домішки, які збільшують мастильну здатність (див., наприклад, документ US 7,691,792). Базова олія для мастила може походити від нафти, рослинної олії, тваринної олії або від бактерій, грибів (дріжджів або нитчастих грибів), водоростей або іншого мікроорганізму. Базова олія також може походити від восків, одержаних з біомаси шляхом газифікації та синтезу Фішера-Тропша. Для характеристики базової олії застосовують показник в'язкості. Зазвичай оптимальним є високий показник в'язкості.

Ліпіди, одержані згідно зі способом, описаним у цьому винаході, можуть застосовуватись як вихідна сировина для виробництва біодизеля, відновлюваного дизельного палива, реактивного палива або бензину. Біодизель складається з метилових естерів жирних кислот, і його зазвичай одержують шляхом трансестерифікації. При трансестерифікації ацилгліцерини перетворюють на довголанцюгові алкілові (метилові, етилові або пропілові) естери жирних кислот. Відновлюване дизельне паливо означає паливо, яке одержують шляхом водневої обробки (водневої деоксигенації, гідрогенізації або гідропроеценгу) ліпідів. При водневій обробці, ацилгліцерини перетворюють на відповідні алкани (парафіни). Алкани (парафіни) можуть піддаватися подальшій модифікації шляхом ізомеризації або з застосуванням інших альтернативних процесів. Процес одержання відновлюваного дизельного палива також може застосовуватися для виробництва реактивного палива та/або бензину. Крім того, для виробництва біопалива може застосовуватися розщеплення ліпідів. Крім того, у деяких випадках ліпіди можуть застосовуватися безпосередньо як біопаливо.

Ліпіди, одержані цим способом, також можуть застосовуватись як базові олії для мастил (мастильних олій) або як вихідний матеріал для виробництва базових олій для мастил.

Суша речовина

"DM" "суха маса" у контексті цього опису означає суху речовину і є мірою маси матеріалу, коли він є підданим обробці, яка по суті видаляє воду з матеріалу (тобто, матеріал повністю висушується).

Консистенція

"Консистенція" означає співвідношення сухої маси твердих речовин із загальною масою суспензії.

Спосіб продукування мікробного ліпиду

У першому аспекті даного винаходу спосіб виробництва ліпідів включає такі етапи:

- (i) забезпечення середовища для культивування, яке включає лігноцелюлозний гідролізат,
- (ii) забезпечення ферментативного бульйону шляхом інокуляції середовища для культивування (i) першим мікробом, причому вищезгаданий перший мікроб є олійстим мікробом,
- (iii) інкубацію вищезгаданого середовища, інокульованого вищезгаданим першим мікробом, що забезпечує можливість накопичення ліпідів,
- причому вищезгаданий ферментативний бульйон включає принаймні один інгібітор росту мікробів,
- і вищезгаданий перший мікроб є толерантним до вищезгаданого(их) інгібітора(ів) росту мікробів,

причому вищезгадану інкубацію здійснюють в аеробних умовах.

Спосіб згідно з винаходом також називається процесом виробництва одноклітинної олії. Спосіб згідно з даним винаходом може бути частиною процесу виробництва біопалива, як описано авторами, згідно з яким олію або принаймні частину олії забезпечують у формі мікробної олії описаним авторами способом.

Згідно з оптимальним варіантом втілення винаходу, середовище для культивування включає лігноцелюлозні цукри, які походять від целюлози та/або геміцелюлози. Згідно з винаходом, фракції геміцелюлози та/або целюлози лігноцелюлозної біомаси застосовують як сировину для виробництва мікробної олії (одноклітинної олії) в одному процесі (системі біореактора). Процес в оптимальному варіанті передбачає використання олійстих мікробів, здатних використовувати як C6 (наприклад, глюкозу, манозу, галактозу), так і C5 (наприклад,

ксилозу, арабінозу) цукри.

Згідно з ще одним варіантом втілення винаходу, середовище для культивування включає геміцелюлозні цукри, які походять від лігноцелюлози. Згідно з ще одним варіантом втілення винаходу, геміцелюлозні цукри принаймні частково перебувають в олігомерній формі, коли

5 подаються на процес виробництва одноклітинної олії.

Згідно з одним оптимальним варіантом втілення винаходу, геміцелюлозну фракцію спочатку відокремлюють від лігноцелюлозного матеріалу. Відокремлення здійснюють у будь-який спосіб, в оптимальному варіанті - шляхом гідротермічної обробки, аутогідролізу та/або парового вибуху з додаванням або без додавання кислот, що в результаті утворює рідку фракцію, яка містить

10 геміцелюлозні цукри, та тверду фракцію, яка містить целюлозу та лігнін. Рідка фракція зазвичай містить сполуки, які інгібують ріст мікроорганізмів, сполуки, які продукуються у процесі фракціонування лігноцелюлози. Ці сполуки є продуктами розпаду лігноцелюлози, такими, як лігнін та цукри, і до них належать фенольні сполуки, фуранові сполуки (фурфурол та його похідні) та органічні кислоти (здебільшого оцтова кислота, мурашина кислота). Також тверда

15 фракція, що містить целюлозу та лігнін, містить інгібіторні сполуки, залежно від ступеня промивання. Згідно з винаходом, середовище для культивування, яке включає рідкий потік з етапу фракціонування, що складається з геміцелюлозних цукрів, може подаватися на культивування без ферментного гідролізу цукрових олігомерів, або, в альтернативному варіанті, потік геміцелюлози, який містить цукрові олігомери, може подаватися на ферментний гідроліз

20 для одержання цукрових мономерів перед застосуванням у мікробному культивуванні. Згідно з винаходом, тверду целюлозно-лігнінову фракцію подають на ферментну обробку для розчинення целюлози та залишкової геміцелюлози (яка не розчиняється на етапі фракціонування) до цукрових мономерів для продукування мікробної олії.

Ліпід зазвичай накопичується як внутрішньоклітинні виступи в олійному мікробі (який називається першим мікробом), однак мікробний ліпід також може бути секретований або частково секретований у ферментативний бульйон, з якого він може бути видобутий. Таким чином, в одному варіанті втілення спосіб також включає етап видобування накопиченого ліпиду з вищезгаданого першого мікроба (олійного мікроба). В іншому варіанті втілення ліпід видобувають з ферментативного бульйону. Видобування ліпідів здійснюють у різні способи, як

30 обговорюється авторами.

Етап інкубації (культивування) (iii) виконують як будь-яке придатне аеробне культивування, включаючи періодичне, періодичне з підживленням або безперервне культивування.

Якщо середовище для культивування, біореактор (ферментер) або системи, з'єднані з біореакторами, не були піддані стерилізації, можуть виникати культури забруднюючих мікробів.

35 Таким чином, якщо такі забруднюючі мікроби не є олійними мікробами, вони можуть конкурувати з олійними мікробами на наявному субстраті, а отже, знижувати вихід ліпідів у продукті.

Ці забруднюючі мікроби (які називаються другими мікробами) є небажаними і мають виключатись або пригнічуватись у системі. Через включення мікробного інгібітора, до якого олійний мікроб є толерантним, зміцнення забруднюючих мікробів (других мікробів) у системі виключається або пригнічується, якщо останні є чутливими або принаймні менш толерантними до вищезгаданого мікробного інгібітора.

40

Якщо лігноцелюлозний гідролізат не було піддано стерилізації, він зазвичай містить один або кілька видів неолійстих мікробів, які, таким чином, є небажаними при культивуванні й підпадають під визначення другого мікроба. Таким чином, в одному варіанті втілення вищезгаданий другий мікроб є неолійстим мікробом.

45

В одному варіанті втілення даного винаходу другі (неолійсті) мікроби надходять або зміцнюються у системі продукування, наприклад, у біореакторі, і, таким чином, забруднюють ферментативний бульйон. Таким чином, в одному варіанті втілення винаходу ферментативний

50 бульйон також включає другий мікроб, який є нетолерантним до вищезгаданого принаймні одного інгібітора росту мікробів. В альтернативному варіанті другий вводять під час підготування до культивування, наприклад, з лігноцелюлозним гідролізатом. Відповідно, в іншому варіанті втілення другий мікроб є присутнім у середовищі для культивування, що забезпечується на етапі (i), або забруднює ферментативний бульйон на етапі (ii) або (iii), або є присутнім у біореакторі.

55

Таким чином, мета даного винаходу полягає в уникненні зміцнення цих забруднюючих мікробів (які називаються другими мікробами) у системі. Це здійснюється шляхом включення принаймні одного інгібітора росту мікробів, до якого олійний мікроб (перший мікроб) є толерантним або принаймні більш толерантним, а забруднюючі мікроби (другі мікроби) є нетолерантними або принаймні менш толерантними порівняно з першим мікробом.

60

З представленого вище опису випливає, що якщо перший мікроб є "толерантним" до інгібітора росту мікробів, це означає, що вищезгаданий перший мікроб (продукуючий олію мікроб) є здатним до проліферації та/або продукування олії навіть у присутності вищезгаданого інгібітора росту мікробів. Крім того, є очевидним, що "нетолерантний" у контексті, наприклад, другого (забруднюючого) мікроба, означає, що ріст вищезгаданого другого мікроба інгібується таким чином, щоб забезпечувалося запобігання проліферації у середовищах, які включають достатню концентрацію вищезгаданого інгібітора росту мікробів.

Зі способів та даних, описаних у розділі прикладів, для спеціаліста у даній галузі стає очевидним спосіб випробування здатності будь-якого продукуючого олію мікробу до проліферації та/або продукування олії на обґрунтованому рівні у присутності інгібітора росту мікробів. Крім того, для спеціаліста у даній галузі на основі способів та даних, представлених у прикладах, також є очевидним, яким чином можна випробувати будь-який другий (потенційно забруднюючий) мікроб на ступінь його нетолерантності до вищезгаданого інгібітора росту мікробів, а отже, яка конкретна концентрація вищезгаданого інгібітора росту мікробів вимагається у середовищах для інгібування проліферації (росту) вищезгаданого другого мікроба. Таким чином, наявними є відомості та способи, які дозволяють випробувати здатність першого (продукуючого олію мікроба) до випередження росту забруднюючих других мікробів за умов, у яких середовище включає інгібітор росту мікробів, у кількості, визначеній у цій заявці, або визначеній експериментально, наприклад, як описано у розділі прикладів.

Таким чином, толерантність означає, що толерантний мікроб є здатним випереджати ріст нетолерантного мікроба у присутності інгібітора росту мікробів.

Таким чином, діапазон толерантності є діапазоном концентрації певного мікробного інгібітора, у межах якого конкретний перший мікроб є здатним до проліферації та продукування олії на рівні, який не відрізняється більше, ніж на 50 % від рівня проліферації або продукування, коли інгібітор росту мікробів є відсутнім у середовищах.

Як можна побачити зі способів та даних, представлених у прикладах, діапазон толерантності може легко визначатися з застосуванням цих способів. Подібним чином "за межами діапазону толерантності" другого мікроба просто означає, що, застосовуючи способи, описані у прикладах, можна визначити, чи перебуває концентрація інгібітора росту мікробів поза межами діапазону толерантності певного другого мікроба. Перебування поза межами діапазону толерантності означає, що така концентрація інгібітора росту мікробів інгібує ріст або проліферацію вищезгаданого другого мікроба принаймні на 20 %, наприклад, принаймні на 30 % або 40 %, або принаймні на 50 % порівняно з тим самим середовищем без вищезгаданого інгібітора росту мікробів.

Може вимагатися спостереження за концентрацією інгібітора росту мікробів, а отже, регулювання концентрації вищезгаданого інгібітора росту мікробів у реакторі під час росту або продукування, оскільки деякі мікроорганізми викликають збільшення або зменшення концентрації, наприклад, фенольних сполук у середовищі. Таким чином, "регулювання концентрації" означає, що концентрація відповідно має регулюватися таким чином, щоб залишатись у потрібному діапазоні, який перебуває у допустимому діапазоні для першого мікроба і поза межами допустимого діапазону для другого мікроба.

Авторами даного винаходу було виявлено, що сполуки (такі, як фенольні сполуки), присутні у лігноцелюлозному гідролізаті, можуть функціонувати як мікробні інгібітори згідно зі способом даного винаходу. Таким чином, в одному варіанті втілення даного винаходу вищезгаданий принаймні один інгібітор росту мікробів є присутнім у середовищі для культивування, що забезпечується на етапі (i), наприклад, у лігноцелюлозному гідролізаті середовища для культивування. Сполуки, які є інгібіторами росту мікробів, також можуть додаватися під час культивування разом з лігноцелюлозним гідролізатом, наприклад, при періодичному культивуванні з підживленням.

Згідно з даним винаходом, олійний мікроб (перший мікроб) є толерантним або принаймні частково толерантним до мікробного інгібітора, присутнього під час культивування. З іншого боку, другий мікроб є нетолерантним до мікробного інгібітора або принаймні менш толерантним до мікробного інгібітора порівняно з першим мікробом, що дозволяє регулювати концентрацію мікробного інгібітора, таким чином, щоб умови для олійного мікроба були більш сприятливими порівняно з другим мікробом.

В одному варіанті втілення даного винаходу вищезгаданий принаймні один інгібітор росту мікробів є присутнім у вищезгаданому ферментативному бульйоні у концентрації у діапазоні толерантності вищезгаданого першого мікроба і поза межами діапазону толерантності вищезгаданого другого мікроба. У ще одному варіанті втілення спосіб також включає етап додавання вищезгаданого принаймні одного інгібітора росту мікробів або регулювання

концентрації вищезгаданого принаймні одного інгібітора росту мікробів у ферментативному бульйоні.

Спосіб згідно з винаходом забезпечує можливість ефективного продукування мікробної олії без потреби у стерилізації середовища для культивування перед приготуванням ферментативного бульйону шляхом його інокулювання олійним мікробом. Таким чином, в одному варіанті втілення даного винаходу спосіб виконується не в асептичних умовах. У ще одному варіанті втілення середовище для культивування, яке включає лігноцелюлозний гідролізат, який забезпечується на етапі (i), не є стерилізованим. Іншими словами, в одному варіанті втілення спосіб згідно з винаходом здійснюють як неасептичний процес (неасептичну операцію).

Стерилізація біореакторів та середовища для культивування також вимагає більше енергії та дорожчої конструкції реактора порівняно з системами біореакторів, які не включають стерилізацію. Таким чином, уникнення стерилізації може поліпшити рентабельність культивування, забезпечуючи можливість дешевого функціонування та зниження інвестиційних витрат.

Авторами даного винаходу було виявлено, що, зокрема, фенольні сполуки, такі, як фенольна сполука, присутня у лігноцелюлозному гідролізаті, після процесу фракціонування лігноцелюлозного матеріалу є особливо придатною як мікробний інгібітор згідно зі способом даного винаходу. Перевага застосування цього класу інгібіторів полягає в тому, що їх включають з лігноцелюлозним гідролізатом, і концентрація може регулюватися таким чином, щоб перебувати у межах діапазону толерантності олійного мікроба (першого мікроба) і поза межами діапазону толерантності другого мікроба (неолійного мікроба) у разі, якщо останній є частково толерантним до мікробного інгібітора.

Спосіб згідно з даним винаходом в оптимальному варіанті передбачає застосування олійних мікробів, які є високотолерантними до інгібіторів на основі лігноцелюлози, що забезпечує широке вікно для регулювання рівня мікробного інгібітора у ферментативному бульйоні.

До інгібіторів, крім інших, належать фенольні сполуки, органічні кислоти, фурфурол та гідроксиметилфурфурол, які є присутніми у геміцелюлозній та/або целюлозній фракціях. Концентрація може регулюватися для досягнення рівня, при якому ріст забруднюючих мікроорганізмів (неолійних мікробів) пригнічується без впливу або принаймні значного впливу на ріст олійного мікроба. Таким чином, оскільки спосіб в оптимальному варіанті передбачає застосування мікробних інгібіторів, присутніх у лігноцелюлозному гідролізаті, гідролізат не піддають видаленню з нього мікробних інгібіторів. Таким чином, в одному варіанті втілення даного винаходу середовище для культивування, яке включає лігноцелюлозний гідролізат, який забезпечується на етапі (i), не піддають процесові детоксикації для видалення вищезгаданого принаймні одного інгібітора росту.

В одному варіанті втілення даного винаходу принаймні один інгібітор росту мікробів являє собою групу фенольних сполук, наприклад, повну групу фенольних сполук, присутніх у лігноцелюлозному гідролізаті (які вимірюються як загальна кількість фенолів на одиницю об'єму, наприклад, г/л). У ще одному варіанті втілення рівень вищезгаданих фенольних сполук у вищезгаданому ферментативному бульйоні становить принаймні 1 г/л. Концентрація може бути досягнута шляхом регулювання концентрації середовища для культивування для досягнення потрібної концентрації у ферментативному бульйоні. Фенольні сполуки аналізують способом Фоліна-Чокальтеу (Waterhouse, 2002), який вказує загальну кількість фенольних сполук у рідині.

У ще одному варіанті втілення рівень вищезгаданих фенольних сполук у вищезгаданому ферментативному бульйоні складає від 1 г/л до 7 г/л або більше (середовище для росту). Згідно з одним варіантом втілення винаходу, концентрація фенольних сполук у ферментативному бульйоні становить від 7 до 10 г/л, згідно з іншим варіантом втілення, концентрація становить від 10 до 20 г/л, і згідно з ще одним варіантом втілення, концентрація фенольних сполук становить від 20 до 50 г/л. У ще одному варіанті втілення рівень вищезгаданих фенольних сполук у вищезгаданому ферментативному бульйоні становить від 1 г/л до 5 г/л, в оптимальному варіанті - у межах від 1 г/л до 3 г/л.

Вміст мікробного інгібітора у лігноцелюлозному гідролізаті (геміцелюлозна та целюлозна фракції) і/або у ферментативному бульйоні може регулюватися різними способами для досягнення потрібного рівня у ферментативному бульйоні.

Концентрація інгібітора у потоці рідкої геміцелюлози може регулюватися шляхом зміни умов (таких, як температура, затримка (час утримання), pH, вміст сухої речовини), наприклад, показника впливу несприятливих умов, на етапі процесу фракціонування лігноцелюлози, який застосовують для (принаймні часткового) розрідження геміцелюлози, наприклад, при гідротермічній обробці, аутогідролізі та/або паровому вибуху з додаванням або без додавання

кислот. Шляхом зміни умов фракціонування лігноцелюлози інгібіторні сполуки регулюють таким чином, щоб в результаті досягався певний рівень інгібіторних сполук у потоці рідини, що містить геміцелюлозу.

В альтернативному варіанті концентрацію мікробних інгібіторів у потоці геміцелюлозного цукру регулюють шляхом очищення потоку геміцелюлози будь-якими відомими способами, включаючи, крім інших, адсорбцію, абсорбцію, фільтрацію, відпарювання, вапнування, випарювання, екстракцію або ферментну обробку.

Як правило, потік цукру, який здебільшого містить геміцелюлозні цукри (багатий на C5 потік), які одержують на етапі фракціонування лігноцелюлози, що в результаті веде до розрідження геміцелюлози (принаймні часткового), містить більшу кількість інгібіторних сполук, таких, як фенольні сполуки, органічні кислоти (такі, як оцтова кислота та мурашина кислота), фурфурол та/або гідроксиметилфурфурол, порівняно з потоком цукру (багатим на C6 потоком), одержаним шляхом ферментного гідролізу твердої фракції, що містить целюлозу та лігнін.

Концентрацію мікробного інгібітора у потоці цукру, який застосовують при культивуванні, регулюють шляхом змішування потоку геміцелюлозного цукру (багатого на C5 потоку) та потоку целюлозного цукру (багатого на C6 потоку). Змішування геміцелюлозного та целюлозного потоку цукру може здійснюватись у будь-якій пропорції для досягнення належної концентрації інгібіторів при культивуванні, що забезпечує можливість росту продукуючих олію організмів, але запобігає або значною мірою інгібує ріст забруднюючих організмів (не здатних до ефективного продукування олії).

Здійснюють обробку до рідин, одержаних від попередньої обробки лігноцелюлози, що в результаті також збільшує концентрацію інгібіторів або збільшує концентрацію певних інгібіторів і видаляє інші інгібітори, які можуть бути сприятливими. Наприклад, випарювання рідини з попередньо обробленого матеріалу, що містить геміцелюлозні вуглеводи, може призводити до підвищеної концентрації нелетких інгібіторів (таких, як фенольні сполуки) та зниженої концентрації летких інгібіторів, таких, як фурфурол, оцтова кислота та мурашина кислота. Таким чином, частина летких сполук, таких, як фурфурол, може бути видалена під час концентрування вуглеводів.

Як правило, при виробництві одноклітинної олії застосовують концентровані цукри. При концентруванні потоків цукру з фракціонування лігноцелюлози та ферментного гідролізу зазвичай застосовують випарювання. В результаті випарювання концентруються нелеткі сполуки, наприклад, фенольні сполуки, у цукровому концентраті. В оптимальному варіанті у виробництві одноклітинної олії використовують організми, які витримують високу концентрацію фенольних сполук.

Згідно з одним, оптимальним варіантом втілення винаходу, потік цукрів від фракціонування лігноцелюлози, який містить геміцелюлозу та целюлозу, концентрують перед подачею на процес виробництва одноклітинної олії, але інший етап очищення не виконують. Таким чином, оптимальна кількість інгібіторів, яка забезпечує можливість росту оліїстих мікроорганізмів, але інгібує ріст забруднюючих неоліїстих мікроорганізмів, досягається шляхом регулювання умов при фракціонуванні лігноцелюлози шляхом випарювання потоків лігноцелюлозного цукру та змішування багатого на геміцелюлозний цукор потоку (C5-сиропу) та багатого на целюлозний цукор потоку (C6-сиропу) у ферментативному бульйоні.

Ферментна обробка передбачає тривалий час утримання (зазвичай від 1 до 3 днів) і, таким чином, є схильною до мікробного забруднення, що спричинює втрату цукру та проблеми з продукуванням мікробної олії (аеробною ферментацією). Згідно з одним, оптимальним варіантом втілення винаходу, фракцію целюлоза+лігнін з етапу фракціонування, що веде до принаймні часткового розрідження геміцелюлози, промивають лише настільки, щоб забезпечувалася можливість ферментної обробки, але інгібувався ріст забруднюючих мікроорганізмів у ферментному гідролізі і, таким чином, знижувалися втрати цукру.

Кількість інгібіторних сполук у твердій фракції з фракціонування лігноцелюлози, що містить целюлозу, регулюють за ступенем промивання твердої целюлозної фракції перед ферментним гідролізом або шляхом зміни умов процесу (такі, як температура, затримка (час утримання), pH) у процесі лігноцелюлозного фракціонування з утворенням твердої целюлозної та лігнінової фракції.

Лігноцелюлозний гідролізат, який застосовують згідно зі способом винаходу

Гідролізат лігноцелюлози, який застосовують згідно зі способом даного винаходу, є продуктом гідролізу лігноцелюлози або лігноцелюлозного матеріалу. Гідролізат лігноцелюлози може бути одержаний з застосуванням одного або кількох видів обробки лігноцелюлози або лігноцелюлозного матеріалу, включаючи гідроліз (гідротермічну обробку та/або аутогідроліз), парового вибуху з додаванням або без додавання кислот, одного або кількох етапів

делігніфікації, наприклад, делігніфікації з застосуванням лужного агента делігніфікації.

Гідролізат лігноцелюлози, який застосовують згідно зі способом винаходу, може бути продуктом будь-якого способу фракціонування лігноцелюлози, у якому геміцелюлози є принаймні частково розчиненими.

В одному варіанті втілення гідролізат лігноцелюлози одержують шляхом обробки лігноцелюлози з аутогідролізом на першому етапі. Аутогідроліз зазвичай виконують при 5-40 % вмісті сухої речовини, при температурах від 140 до 240 °C протягом 1-120 хв без додавання кислотних сполук, що веде до розчинення 5-40 % вмісту сухої речовини у лігноцелюлозному матеріалі, що включає геміцелюлозні вуглеводи. Зазвичай екстрагування гарячою водою розчиняє від 30 до 100 % геміцелюлозних вуглеводів з лігноцелюлозного матеріалу, в оптимальному варіанті – >50 %, у ще кращому варіанті – >70 %, у ще кращому варіанті – >80 %, у ще кращому варіанті – >90 %. Розчинені геміцелюлозні вуглеводи принаймні частково перебувають в олігомерній формі. У більш типовому варіанті аутогідроліз виконують при 10-30 % вмісті сухої речовини при 160-220 °C, залежно від лігноцелюлозної сировини матеріал. Після аутогідролізу тверду та рідку фази розділяють у будь-який спосіб, такий, як фільтрація, наприклад, фільтрація під тиском, або за допомогою гвинтового преса. Тверда фракція може бути піддана промиванню для видалення розчиненої геміцелюлози з твердої фази.

Згідно з ще одним варіантом втілення винаходу, гідролізат лігноцелюлози є продуктом обробки лігноцелюлози парою або з застосуванням парового вибуху з додаванням або без додавання кислотних сполук, зазвичай при температурах від 110 до 250 °C, у більш типовому варіанті - при температурах від 140 до 230 °C. Результатом обробки є розчинені геміцелюлозні вуглеводи. Необов'язково твердий матеріал від парового вибуху промивають для видобування розчинених геміцелюлозних вуглеводів.

Згідно з ще одним варіантом втілення винаходу, гідролізат лігноцелюлози є продуктом обробки лігноцелюлози амонієм для розчинення геміцелюлозних вуглеводів, які містять олігомери. Згідно з одним варіантом втілення винаходу, застосовують руйнування целюлози аміаком (AFEX) або перколяцію аміаком у режимі рециркуляції з температурою від 60 C до 220 °C.

Під час обробки лігноцелюлозного матеріалу інші органічні, відмінні від вуглеводів, сполуки, такі, як фенольні сполуки (такі, як 4- гідроксибензойна кислота, р-кумарова кислота, ванілінова кислота, ванілін, фенол, гваякол, гідрохінон, катехол, ферулова кислота, сирінгальдегід, бузкова кислота), фурфурол, гідроксиметилфурфурол (HMF), оцтова кислота, мурашина кислота та левулінова кислота, зазвичай утворюються й вивільнюються, розчиняючись у рідкій фазі разом з геміцелюлозними вуглеводами. Крім того, можуть вивільнюватися екстрактивні речовини, такі, як капроева кислота, каприлова кислота, пальмітинова кислота та пеларгонова кислота.

Фенольні сполуки, фурфурол, гідроксиметилфурфурол, оцтова кислота та мурашина кислота зазвичай інгібують ріст мікробів. Концентрація сполук, які викликають інгібування росту, залежить від мікроорганізму. Деякі продукуючі олію мікроорганізми, в оптимальному варіанті – гриби, у ще кращому варіанті – нитчасті гриби, є високотолерантними до інгібіторних сполук, таких, як фенольні сполуки, фурфурол, HMF, оцтова кислота та мурашина кислота, які утворюються при попередній обробці лігноцелюлози (тобто, гідролізі, фракціонуванні).

Як згадується авторами, мікробні інгібітори, які утворюються під час фракціонування лігноцелюлозного матеріалу для одержання гідролізату лігноцелюлози, є особливо придатними як мікробні інгібітори згідно зі способом даного винаходу.

Використання олійних продукуючих організмів, які є високотолерантними до цих інгібіторних сполук, є сприятливим, оскільки це може знизити потребу та складність елементарних операцій для видалення інгібіторів, а також зменшити або виключити ріст забруднюючих мікроорганізмів у процесі аеробної ферментації при виробництві одноклітинної олії.

Перший мікроб

На одному етапі способу середовище для культивування, яке включає лігноцелюлозний гідролізат, інокулюють першим мікробом, яким є продукуючий ліпіди мікроб (олійстий мікроб). В одному варіанті втілення даного винаходу перший мікроб (олійстий мікроб) вибирають з переліку, який складається з нитчастих грибів, дріжджів, бактерій та водоростей або бактерій. В оптимальному варіанті використовують організми, здатні використовувати C6 та C5 цукри.

Олійстий мікроб може продукувати ліпіди природним шляхом, або ж олійстий мікроб може бути одержаний шляхом генетичної модифікації, що збільшує продукування внутрішньоклітинного ліпіду та здатність мікроба до накопичення внутрішньоклітинних ліпідів.

У контексті даного винаходу перший мікроб (олійстий мікроб) означає мікроорганізм, здатний накопичувати внутрішньоклітинні ліпіди, таким чином, щоб ліпіди складали принаймні 15 % (маса/маса) від загальної біомаси (на суху масу клітин) мікроба при культивуванні за

відповідних умов. Таким чином, в одному варіанті втілення даного винаходу вищезгаданий перший мікроб (оліїстий мікроб) є здатним продукувати й накопичувати понад 15 % його маси у формі ліпиду (на суху масу клітин). В оптимальному варіанті втілення перший мікроб (оліїстий мікроб) є здатним накопичувати принаймні 20 % (маса/маса) від загальної біомаси мікроба (на суху масу клітин).

Таким чином, мікроби, які не підпадають під вищезазначене визначення стосовно їх здатності до накопичення внутрішньоклітинних ліпідів, вважаються неоліїстими мікробами, а отже, небажаними під час інкубації. У контексті даного винаходу другий мікроб означає неоліїстий мікроб, тобто, здатність другого мікроба до накопичення внутрішньоклітинних ліпідів є нижчою за 15 % (маса/маса) від загальної біомаси (на суху масу клітин) при культивуванні за відповідних умов.

В одному варіанті втілення даного винаходу перший мікроб (оліїстий мікроб) вибирають з групи, яка складається з *Mortierella*, *Aspergillus*, *Lipomyces*, *Rhodosporidium* та *Cryptococcus*. Авторами винаходу було виявлено, що види цих родів є особливо толерантними до мікробного інгібітора, присутнього у лігноцелюлозному гідролізаті, такого, як обговорювані в цьому описі фенольні сполуки.

До неоліїстих мікробів (других мікробів) належать неоліїсті бактерії, включаючи, крім інших, *Bacillus* spp. та *Pseudomonas* spp. Таким чином, в одному варіанті втілення даного винаходу другий мікроб є вибраним з групи, до якої належать види *Bacillus*, такі, як *Bacillus subtilis*., види *Pseudomonas*, такі, як *Pseudomonas fluorescens*. Авторами винаходу було виявлено, що ці неоліїсті мікроби не є толерантними до мікробних інгібіторів, присутніх у лігноцелюлозному гідролізаті, зокрема, фенольних сполук лігногідролізату целюлози.

Згідно з іншим варіантом втілення винаходу, неоліїстий другий мікроб, вибраний з-поміж неоліїстих дріжджів, неоліїстих нитчастих грибів або неоліїстих мікроводоростей.

Таким чином, якщо другий мікроб (неоліїстий мікроб) не є толерантним до мікробних інгібіторів у формі фенольних сполук лігногідролізату целюлози, оліїстий мікроб (перший мікроб) в оптимальному варіанті вибирають з-поміж оліїстих мікробів, які є особливо толерантними до фенольних сполук, присутніх у лігноцелюлозному гідролізаті.

Таким чином, в одному варіанті втілення даного винаходу перший мікроб (оліїстий мікроб) вибирають з групи, до якої належать *Mortierella*, *Aspergillus*, *Lipomyces*, *Rhodosporidium* та *Cryptococcus*, і принаймні один інгібітор росту мікробів являє собою групу фенольних сполук, таким чином, що загальна група фенольних сполук, присутніх у лігноцелюлозному гідролізаті (виміряна як загальна концентрація фенолу на одиницю об'єму ферментативного бульйону, наприклад, у г/л), в оптимальному варіанті - рівень вищезгаданих фенольних сполук у вищезгаданому ферментативному бульйоні, складає принаймні 1 г/л, наприклад, у межах від 1 г/л до 7 г/л або більше (середовище для росту). У ще одному варіанті втілення рівень вищезгаданих фенольних сполук у вищезгаданому ферментативному бульйоні становить від 1 г/л до 5 г/л, в оптимальному варіанті - від 1 г/л до 3 г/л. Згідно з одним варіантом втілення винаходу, концентрація фенольних сполук у ферментативному бульйоні становить від 7 до 10 г/л, згідно з іншим варіантом втілення концентрація становить від 10 до 20 г/л, і згідно з ще одним варіантом втілення, концентрація фенольних сполук становить від 20 до 50 г/л.

Ферментативний бульйон та його застосування

Другий аспект даного винаходу стосується ферментативного бульйону, який включає лігноцелюлозний гідролізат, принаймні один інгібітор росту мікробів та оліїстий мікроб, причому вищезгаданий оліїстий мікроб є толерантним до вищезгаданого(их) інгібітора(ів) росту мікробів.

В оптимальному варіанті вищезгаданий принаймні один інгібітор росту мікробів є присутнім у лігноцелюлозному гідролізаті як сполука, що утворюється шляхом попереднього фракціонування лігноцелюлозного матеріалу для одержання лігногідролізату целюлози.

Вміст мікробного інгібітора у лігноцелюлозному гідролізаті (геміцелюлозній та целюлозній фракціях) і/або у ферментативному бульйоні, таким чином, може регулюватися для досягнення потрібного рівня у ферментативному бульйоні. В оптимальному варіанті принаймні один мікробний інгібітор є фенольною сполукою лігногідролізату целюлози, а оліїстий мікроб є оліїстим мікробом, толерантним до фенольних сполук, присутніх у лігноцелюлозному гідролізаті.

Інший аспект стосується застосування ферментативного бульйону згідно з даним винаходом згідно зі способом виробництва мікробного ліпиду.

Ще один аспект стосується застосування композиції, яка включає принаймні один інгібітор росту мікробів, у способі виробництва ліпиду, причому ліпід продукується й накопичується в оліїстому мікробі, і вищезгаданий оліїстий мікроб є толерантним до вищезгаданого принаймні одного інгібітора росту мікробів. В оптимальному варіанті втілення композиція лігногідролізату

целюлози та принаймні одного мікробного інгібітора є фенольною сполукою, присутньою у лігноцелюлозному гідролізаті, до якої є толерантним вищезгаданий оліїстий мікроб.

В одному оптимальному варіанті втілення винаходу культивування для продукування мікробної олії на лігноцелюлозних гідролізатах виконують у нестерильних умовах. Згідно з іншим оптимальним варіантом втілення винаходу, бульйон для культивування (який також називається ферментативним бульйоном), який містить лігноцелюлозний гідролізат, обробляють нагріванням, але не стерилізують, наприклад, пастеризують, і використовують у процесі виробництва одноклітинної олії. Згідно з іншим оптимальним варіантом втілення винаходу, теплова обробка бульйону, який містить лігноцелюлозний гідролізат, являє собою етап випарювання, який застосовують до концентрування цукрів у лігноцелюлозних гідролізатах. Теплова обробка (наприклад, пастеризація та/або випарювання) у комбінації з інгібіторними сполуками, одержаними з лігноцелюлози, забезпечує можливість неасептичного культивування у виробництві одноклітинної олії.

В описі варіантів втілення даного винаходу комбінації та пермутації всіх можливих варіантів втілення прямо не описувалися. Незважаючи на це, лише той факт, що певні заходи вказуються у відмінних один від одного залежних пунктах формули винаходу або описуються у різних варіантах втілення, не означає, що комбінація цих заходів не може бути вигідно використана. Даний винахід передбачає всі можливі комбінації та пермутації описаних варіантів втілення.

Терміни "включаючи", "включати" та "включає" вживаються заявником як необов'язково заміщені термінами "складаючись із", "складатися з" або "складається з", відповідно, у кожному з випадків.

Пункти

Далі винахід описується по необмежувальних пунктах.

Пункт 1. Спосіб виробництва ліпідів, який включає такі етапи:

(i) забезпечення середовища для культивування, яке включає лігноцелюлозний гідролізат, (ii) забезпечення ферментативного бульйону шляхом інокуляції середовища для культивування (i) першим мікробом, причому вищезгаданий перший мікроб є оліїстим мікробом, (iii) інкубацію вищезгаданого середовища, інокульованого вищезгаданим першим мікробом, що забезпечує можливість накопичення ліпідів,

причому вищезгаданий ферментативний бульйон включає принаймні один інгібітор росту мікробів,

і вищезгаданий перший мікроб є толерантним до вищезгаданого(их) інгібітора(ів) росту мікробів,

причому вищезгадану інкубацію здійснюють в аеробних умовах.

Пункт 2. Спосіб за пунктом 1, який також включає етап видобування накопиченого ліпиду з вищезгаданого першого мікроба.

Пункт 3. Спосіб за пунктом 1 або 2, який відрізняється тим, що вищезгаданий ферментативний бульйон також включає другий мікроб, який не є толерантним до вищезгаданого принаймні одного інгібітора росту мікробів.

Пункт 4. Спосіб за пунктом 3, який відрізняється тим, що вищезгаданий другий мікроб є присутнім у середовищі для культивування, яке забезпечується на етапі (i) або забруднює ферментативний бульйон на етапі (ii) або (iii).

Пункт 5. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що вищезгаданий другий мікроб є неоліїстим мікробом.

Пункт 6. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що вищезгаданий принаймні один інгібітор росту мікробів є присутнім у середовищі для культивування, що забезпечується на етапі.

Пункт 7. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що вищезгаданий принаймні один інгібітор росту мікробів є присутнім у вищезгаданому ферментативному бульйоні у концентрації у діапазоні толерантності вищезгаданого першого мікроба і поза межами діапазону толерантності вищезгаданого другого мікроба.

Пункт 8. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що також включає етап додавання вищезгаданого принаймні одного інгібітора росту мікробів або регулювання концентрації вищезгаданого принаймні одного інгібітора росту мікробів у ферментативному бульйоні.

Пункт 9. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що принаймні один інгібітор росту мікробів являє собою групу фенольних сполук (яку вимірюють як концентрацію загальних фенолів на одиницю об'єму ферментативного бульйону).

Пункт 10. Спосіб за пунктом 9, який відрізняється тим, що рівень вищезгаданих фенольних сполук у вищезгаданому ферментативному бульйоні становить принаймні 1 г/л.

Пункт 11. Спосіб за пунктами 9 або 10, який відрізняється тим, що рівень вищезгаданих фенольних сполук у вищезгаданому ферментативному бульйоні становить від 1 г/л до 7 г/л або більше (середовище для росту).

5 Пункт 12. Спосіб за будь-яким з пунктів з 9 по 11, який відрізняється тим, що рівень вищезгаданих фенольних сполук у вищезгаданому ферментативному бульйоні перебуває у діапазоні від 1 г/л до 5 г/л, в оптимальному варіанті - у діапазоні від 1 г/л до 3 г/л.

Пункт 13. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що вищезгаданий перший мікроб вибирають з переліку, який складається з нитчастих грибів, дріжджів, бактерій та водоростей.

10 Пункт 14. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що вищезгаданий перший мікроб вибирають з групи, до якої належать *Mortierella*, *Aspergillus*, *Lipomyces*, *Rhodosporidium* та *Cryptococcus*.

Пункт 15. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що вищезгаданий другий мікроб є неоліїстим і вибраним з переліку, який складається з бактерій, дріжджів, нитчастих грибів або мікроводоростей.

Пункт 16. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що вищезгаданий другий мікроб є бактерією, вибраною з групи, до якої належать види *Bacillus*, *Pseudomonas*.

20 Пункт 16. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що середовище для культивування, що включає лігноцелюлозний гідролізат, який забезпечують на етапі (i), не піддають стерилізації.

Пункт 17. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що середовище для культивування, яке включає лігноцелюлозний гідролізат, який забезпечують на етапі (i), не піддають процесові детоксикації для видалення вищезгаданого принаймні одного інгібітора росту.

Пункт 18. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що спосіб здійснюють не за асептичних умов.

30 Пункт 19. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, який відрізняється тим, що вищезгаданий перший мікроб є здатним до продукування та накопичення більш, ніж п'ятнадцяти відсотків від його маси ліпиду (на суху масу клітин).

Пункт 20. Ферментативний бульйон, який включає лігноцелюлозний гідролізат, принаймні один інгібітор росту мікробів та оліїстий мікроб, причому вищезгаданий оліїстий мікроб є толерантним до вищезгаданого(их) інгібітора(ів) росту мікробів.

35 Пункт 21. Застосування ферментативного бульйону за пунктом 20 у способі виробництва ліпиду.

Пункт 22. Застосування композиції, яка включає принаймні один інгібітор росту мікробів, у способі виробництва ліпиду, причому ліпід продукується й накопичується в оліїстому мікробі, і вищезгаданий оліїстий мікроб є толерантним до вищезгаданого принаймні одного інгібітора росту мікробів.

40 Приклади

Приготування лігноцелюлозних гідролізатів для культивування

Аутогідролізна рідина А

45 Аутогідролізну рідину А приготувляли шляхом піддавання пшеничної соломи аутогідролізній обробці при 195 °C з наступним паровим вибухом до навколишньої температури та тиску. Після аутогідролізу матеріал суспендували у водопровідній воді для відокремлення розчинених геміцелюлозних цукрів. Відокремлення твердих речовин від рідини здійснювали шляхом фільтрації під тиском до утворюючої суспензії рідкої фази, яка містить геміцелюлозу, та твердої фази, яка містить целюлозу та лігнін. Рідку фазу (яка містить геміцелюлозні цукри, частково в олігомерній формі) концентрували для одержання аутогідролізної рідини А, яку застосовували у культивуванні. Аутогідролізна рідина А містила 112 г/л цукрів згідно з аналізом з застосуванням вискоєфективної рідинної хроматографії (HPLC) та 13 г/л фенольних сполук згідно з аналізом з застосуванням способу Фоліна-Чокальтеу (Waterhouse, 2002).

В експерименті з культивуванням гідролізат розводили водою для одержання потрібної концентрації бульйону для культивування.

55 Аутогідролізна рідина В

60 Аутогідролізну рідину В приготувляли з пшеничної соломи шляхом обробки, яка складалася з промивання соломи з наступним аутогідролізом. Першу пшеничну солому (38,1 кг DM) промивали у 500 дм³ реакторі з мішалкою з водою при 80 °C. Першу тверду фракцію відокремлювали від першої рідкої фракції за допомогою фільтра Зейца. Першу тверду фракцію (34,7 кг DM) вручну завантажували у 500 дм³ реактор і змішували з водою для одержання

суспензії при консистенції 8,6 %. Суспензію нагрівали до 175 °C (9,8 бар) і тиск ослабляли шляхом відкривання клапана, сполученого з реактором. Другу рідку фракцію відокремлювали від другої твердої фракції у декантерній центрифугі. Другу тверду фракцію піддавали одноразовому суспензійному промиванню водою, а третю рідку фракцію відокремлювали від промитої твердої фракції (128 кг з вмістом сухої речовини 16,9 %). Другу та третю рідкі фракції комбінували, пропускали крізь мішковий фільтр і одержаний фільтрат (514 кг) обробляли активованим вугіллям (4,1 кг) при кімнатній температурі. Рідину, оброблену активованим вугіллям, освітлювали й концентрували у випарнику з падаючою плівкою для одержання 23,8 кг концентрованої аутогідролізної рідини, яка мала 16,3 % вміст сухої речовини та 18 °Вх вміст сухої речовини, визначений рефрактометричним способом. Концентровану аутогідролізну рідину знову концентрували шляхом випарювання для одержання аутогідролізної рідини В, яка мала показник рН 4,8 та вміст сухої речовини 44,6 %, з яких загальний вміст вуглеводів складав 78,1 % (маса/маса). Вміст вуглеводів визначали шляхом вискоефективної рідинної хроматографії (HPLC) після гідролізу зразка розведеною кислотою (4 % (маса/маса) сірчаної кислоти, 121 °C, 1 год.). Концентрація фенольних сполук становила 31 г/л згідно з аналізом з застосуванням способу Фоліна-Чокальтеу (Waterhouse, 2002).

Після цього в експериментах з культивування застосовували аутогідролізну рідину (яка містила геміцелюлозні цукри, частково в олігомерній формі) як таку.

Аутогідролізна рідина С

Реакцію аутогідролізу для пшеничної соломи та наступне відокремлення геміцелюлозних олігосахаридів здійснювали для одержання рідкої фракції для ферментації та твердої фракції, сприйнятливої до ферментного гідролізу. Для досягнення цього 35,7 кг пшеничної соломи (89,8 % вміст сухої речовини) змішували з 240 кг води, одержуючи суспензію при консистенції 11,6 % у 500 дм³ реакторі з мішалкою. Суспензію нагрівали до 180 °C з наступним охолодженням до температури нижче 100 °C. Гідротермічно оброблену суспензію видаляли з реактора і першу рідку фракцію відокремлювали від твердої фракції, застосовуючи декантерну центрифугу. Тверду фракцію піддавали суспензійному промиванню у кислій воді, доведеної до рН 4 фосфорною кислотою. Тверду фракцію відокремлювали від двоглої рідкої фракції у декантерній центрифугі. Першу та другу рідкі фракції комбінували й концентрували у випарнику з падаючою плівкою для одержання 18,3 кг концентрованої аутогідролізної рідини з утворенням аутогідролізної рідини С, яка містила геміцелюлозні цукри, частково в олігомерній формі, і з вмістом сухої речовини 42 % та 38 °Вх вмістом сухої речовини, визначеним рефрактометричним способом. Промиту тверду фракцію (96,7 кг, з вмістом сухої речовини 23,0 %) застосовували як завантажуваний матеріал для ферментного гідролізу для утворення гідролізату целюлози для культивування.

Частину фенольних сполук, яку містив концентрат аутогідролізної рідини, видаляли шляхом обробки рідини з додаванням 40 г/л активованого вугілля, обережного змішування протягом 20 годин при 4 °C з кінцевим відфільтровуванням вугілля з застосуванням 400 мкм фільтрувальної тканини. Цю рідину використовували у прикладі 3 (очищена аутогідролізна рідина С). У прикладі 4 гідролізат використовували як такий, без очищення.

Ферментний гідролізат з целюлозної фракції пшеничної соломи приготували з твердої фракції, яка містила целюлозу (після промивання) з експерименту аутогідролізу, при якому приготували аутогідролізну рідину С. Промиту тверду фракцію від аутогідролізної обробки з утворенням аутогідролізної рідини С (17,3 кг з вмістом сухої речовини 23,1 %) відважували у 40 дм³ реактор з мішалкою і змішували з 14,7 кг води та 10 мл 50 % NaOH (маса/маса) для утворення суспензії при консистенції 12,5 % та рН 5. Реактор нагрівали й тримали при 50 °C та 216 мл ферментної суміші, яка включала 82 % целюлози (Econase CE, Roal Oy), 10 % целобіази (Novozyme 188, Sigma/Novozymes) та 7 % ксиланази (GC140, Genencor). Під час ферментної обробки суспензію періодично перемішували тричі на годину протягом 5 хв. Після 48 год. часу утримання суспензію доповнювали свіжою ферментною сумішшю, яка складає 10 % від первісної дози ферменту і має подібні пропорції окремих ферментів. Після 72 год. часу утримання при 50 °C рідку фракцію відокремлювали від твердої фракції шляхом фільтрації з застосуванням гідропреса. Тверду фракцію один раз промивали водою і рідку фракцію знову відокремлювали від твердої фракції. Рідкі фракції комбінували й концентрували шляхом випарювання під зниженим тиском. Концентрат гідролізату целюлози (1,57 кг) містив 220 г/л загального цукру.

Гідролізат целюлози, що містить мономерні цукри застосовували у культивуванні як такий.

Аутогідролізна рідина D

Суспензію приготували шляхом змішування 10,5 кг перемеленої пшеничної соломи (вміст сухої речовини 92,7 %) та 54,1 кг водопровідної води у 100 дм³ резервуарі. Після зберігання при

кімнатній температурі протягом 18 год. 64,2 кг суспензії відважували у горизонтальний циліндричний 250 дм³ автоклавний реактор з перемішуванням. Реактор закривали й нагрівали протягом 75 хв до 140 °С, підтримували при 140 °С протягом 5 год. і охолоджували до кімнатної температури протягом 30 хв. Гідротермічно оброблену суспензію вручну вивантажували з реактора і першу рідку фракцію відокремлювали від першої твердої шляхом фільтрації. Першу тверду фракцію двічі промивали водопровідною водою і пресували, застосовуючи гідропрес, з одержанням промитої твердої фракції. Промита тверда фракція (20,9 кг) мала вміст сухої речовини 42,7 %. Першу рідку фракцію комбінували з промивальною водою і концентрували у випарнику з падаючою плівкою до вмісту сухої речовини 11,5 % (маса/маса). Концентрована рідина, аутогідролізна рідина D, містила 49,3 % загального цукру від загальної сухої речовини концентрованої рідини, як визначали після гідролізу розведеною кислотою (4 % (маса/маса) сірчаної кислоти, 121 °С, 1 год.) шляхом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC). Відносні пропорції безводної ксилози, безводної арабінози, безводної глюкози та безводної галактози від загального вмісту цукру становили 57 %, 19 %, 13 % та 11 %, відповідно.

Після цього аутогідролізу рідину D, яка містила геміцелюлозні цукри, частково в олігомерній формі, застосовували в експериментах з культивуванням як таку.

Приклад 1 - Вплив оцтової кислоти та мурашиної кислоти на ріст грибків

Експерименти здійснювали, використовуючи продукуєний ліпіди грибковий штам *Aspergillus.oryzae*. Зі спорогенного гриба, вирощуваного на PDA-планшетах, приготували суспензію спор шляхом додавання 12 мл стерильної води і спори зіскрібали з застосуванням мікробіологічної петлі у рідину. Суспензію спор використовували для інокуляції середовища.

Основні компоненти середовища представлено у таблиці 1. Усі вони містили ці основні поживні речовини та малу кількість тонко подрібненої целюлози для запобігання грудкуванню грибів.

Таблиця 1:

Основний склад середовища

	г/л
Целюлоза	2
солодовий екстракт	30
Пептон	3

Середовище приготували, використовуючи водопровідну воду.

Органічні кислоти додавали таким чином, щоб концентрація мурашиної та оцтової кислоти окремо складала 0, 1, 3, 5 та 7 г/л, а для двох кислот разом – 0, 1, 3, 5, 7 та 9 г/л. Після цього рН середовища доводили до 5,5-6,0, використовуючи 3 М NaOH. Середовище розподіляли по 50 мл партіях у 250 мл колбах Ерленмеєра. Середовища стерилізували в автоклаві при 121 °С протягом 15 хв. Після охолодження кожну колбу інокулювали, використовуючи 0,5 мл суспензії спор, як згадано вище. Для кожної концентрації здійснювали паралельне культивування. Культури інкубували зі збовтуванням при 160 об/хв при 28 °С протягом 5 днів. Ріст спостерігали щодня за допомогою мікроскопа і наприкінці культивування визначали вміст біомаси та ліпідів.

Вміст біомаси визначали шляхом вакуум-фільтрації всього вмісту колби та промивання біомаси з використанням 50 мл дистильованої води. Після цього осад біомаси на фільтрі заморожували і висушували протягом доби у ліофілізаторі. Вміст ліпідів з висушеної біомаси аналізували згідно з публікацією Suutari et al. (1990). Ліпіди у зразках спочатку гідролізували у вільні жирні кислоти, які омилювали до їх натрієвих солей, а потім метилювали до метилових естерів. Жирні метилові естери аналізували за допомогою газової хроматографії.

Результати: в усіх колбах, незалежно від концентрації кислоти, ріст починався майже одночасно. Показники концентрації біомаси та ліпідів також були дуже подібними. На основі цих результатів можна твердити, що випробувані кислоти, окремо або разом, не мали впливу на ріст грибків або продукування ліпідів. Показники концентрації біомаси та ліпідів представлено у таблиці 2.

Таблиця 2:

Концентрація біомаси та вміст ліпідів при різних концентраціях кислот.

Концентрація оцтової кислоти, г/л	Концентрація біомаси, г/л	Вміст ліпідів (% від сухої маси клітин)
0	12,4	20,1
1	12,4	19,8
3	11,4	20,7
5	11,1	21,2
7	11,5	24,3

Концентрація мурашиної кислоти (г/л)	Концентрація біомаси, г/л	Вміст ліпідів (% від сухої маси клітин)
0	12,9	18,9
1	12,5	19,5
3	12,0	19,5
5	11,2	15,9
7	10,9	19,8

Концентрація оцтової та мурашиної кислоти (г/л)	Концентрація біомаси, г/л	Вміст ліпідів (% від сухої маси клітин)
0	12,9	18,9
1	12,4	20,3
3	11,6	18,1
5	11,0	22,0
7	10,4	17,4
9	9,5	15,9

5 Приклад 2 - Інгібіторний вплив фенольних сполук

Експерименти здійснювали, використовуючи продукуючі грибові та дріжджові штами *Aspergillusoryzae*, *Mortierella. isabellina* та *Lipomyces starkeyi*. Випробували два різні лігноцелюлозні гідролізати від аутогідрозної обробки лігноцелюлози, які містили геміцелюлозні цукри та помітну кількість фенолів, аутогідролізну рідину А та аутогідролізну рідину В. Фенольні сполуки визначали згідно зі способом Фоліна-Чокальтеу з галовою кислотою як стандартом (Waterhouse, 2002).

Зі спорогенного гриба, вирощуваного на PDA-планшетах приготувляли суспензію спор шляхом додавання 12 мл стерильної води і спори зіскрібали з застосуванням мікробіологічної петлі у рідину. Суспензію спор використовували для інокуляції середовища.

Основні компоненти середовища представлено у таблиці 3. Усі вони містили ці основні поживні речовини та малу кількість тонко подрібненої целюлози для запобігання грудкуванню грибів.

Таблиця 3:

Склад середовища для росту

	г/л
глюкоза	20
солодовий екстракт	30
Пептон	3

Середовище приготувляли, використовуючи водопровідну воду.

Аутогідролізну рідину А або В додавали таким чином, щоб концентрація фенолів становила 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 та 7 г/л. Після цього рівень рН середовищ доводили до 6,5, застосовуючи 3 М NaOH. Середовище розподіляли по 50 мл партіях у 250 мл колбах Ерленмеєра. Середовища стерилізували в автоклаві при 121 °С протягом 15 хв. Після охолодження кожну колбу інокулювали, використовуючи 0,5 мл суспензії спор, як згадано вище у разі грибів, а для

дріжджів використовували попередньо культивовану дріжджову суспензію. Для кожної концентрації здійснювали паралельне культивування. Грибкові культури інкубували зі збовтуванням при 160 об/хв і дріжджі - при 160 об/хв, усі при 28 °C протягом 5 днів. Ріст спостерігали двічі на день за допомогою мікроскопа і наприкінці культивування визначали вміст біомаси.

Вміст грибкової біомаси визначали шляхом вакуум-фільтрації всього вмісту колби та промивання біомаси з використанням 50 мл дистильованої води. Після цього осади біомаси на фільтрі заморожували і висушували протягом доби у ліофілізаторі і визначали вміст біомаси.

Вміст дріжджової біомаси визначали шляхом відмірювання у попередньо зважені пробірки 7 мл випробуваної суспензії для росту, паралельних зразків з кожної колби. Зразки центрифугували при 6000 об/хв протягом 10 хв, після чого супернатант видаляли, додавали 7 мл дистильованої води, вміст пробірки добре перемішували і центрифугування повторювали. Промивальну воду після цього видаляли і осад біомаси та супернатанти заморожували. Потім зразки біомаси висушували заморожуванням і визначали вміст біомаси.

Результати:

При мікроскопічному спостереженні можна побачити, що зі збільшенням фенольної концентрації час, необхідний для початку росту, дещо збільшується для деяких мікробів. Культивування спостерігали двічі на день, тому визначення конкретного моменту початку росту є неможливим, проте можна зробити приблизні оцінки. Для дріжджів *L. starkeyi* та грибка *A. oryzae* не спостерігалось помітного відставання при жодній з випробуваних фенольних концентрацій, і всі починали рости після одного дня інкубації. Натомість грибок *M. isabellina* починав рости повільніше, коли фенольна концентрація збільшувалася до рівня понад 4 г/л.

A. oryzae міг рости навіть при найвищій випробуваній фенольній концентрації 7 г/л, але вміст біомаси зменшувався, коли фенольна концентрація збільшувалася. *L. starkeyi* та *M. isabellina* могли рости при концентрації до 6 г/л, а при 7 г/л ріст не виявлявся. Подібно до *A. oryzae*, вміст біомаси зменшувався при зростанні фенольної концентрації. Розбіжностей між різними гідролізатами від інгібування аутогідролізу не виявлялося. Нижче у таблиці представлено вміст біомаси для мікробів, випробуваних у різних фенольних концентраціях.

Таблиця 4:

Вміст біомаси для мікробів, випробуваних у різних фенольних концентраціях.

Мікроб	Аутогідролізна рідина	Фенольна концентрація, (г/л)	Концентрація біомаси, (г/л)
<i>Mortierella isabellina</i>	A	0	12,4
<i>Mortierella isabellina</i>	A	1	10,7
<i>Mortierella isabellina</i>	A	2	10,4
<i>Mortierella isabellina</i>	A	3	7,4
<i>Mortierella isabellina</i>	A	4	5,1
<i>Mortierella isabellina</i>	A	5	1,5
<i>Mortierella isabellina</i>	A	6	0
<i>Mortierella isabellina</i>	A	7	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	0	15,0
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	1	15,4
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	2	13,2
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	3	11,4
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	4	11,8
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	5	11,2
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	6	11,1
<i>Aspergillus oryzae</i>	A	7	7,6
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	0	14,7
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	2	13,8
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	3	10,1
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	4	8,5
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	5	3,7
<i>Lipomyces starkeyi</i>	A	6	0,6
<i>Mortierella isabellina</i>	B	0	12,54
<i>Mortierella isabellina</i>	B	2	7,7709
<i>Mortierella isabellina</i>	B	3	6,4339
<i>Mortierella isabellina</i>	B	4	4,9039
<i>Mortierella isabellina</i>	B	5	3,8129
<i>Mortierella isabellina</i>	B	6	0,6259

Продовження Таблиці 4

Mortierella isabellina	B	7	-
Aspergillus oryzae	B	0	14,9
Aspergillus oryzae	B	3	9,5
Aspergillus oryzae	B	4	8,0
Aspergillus oryzae	B	5	6,8
Aspergillus oryzae	B	6	6,8
Aspergillus oryzae	B	7	5,3
Lipomyces starkeyi	B	0	14,7
Lipomyces starkeyi	B	2	10,4
Lipomyces starkeyi	B	4	6,5
Lipomyces starkeyi	B	5	5,6
Lipomyces starkeyi	B	6	3,3

Приклад 3 - Ріст грибків та продукування ліпідів на цукрах геміцелюлози пшеничної соломи та гідролізату целюлози

- 5 Експерименти здійснювали, застосовуючи продукуєний ліпід грибковий штам *A.oryzae*. Зі спорогенного гриба, вирощуваного на PDA-планшетах а приготувляли суспензію спор шляхом додавання 12 мл стерильної води і спори зіскрібали з застосуванням мікробіологічної петлі у рідину. 24 мл суспензії спор безпосередньо використовували для інокуляції у біореакторі. Склад середовища представлено у таблиці 5. Для культивування використовували очищену аутогідролізну рідину С (розчин геміцелюлози) та гідролізат целюлози з того самого експерименту. Культивування здійснювали у 5 л біореакторі Biostat B plus в об'ємі 3 л, і в цей час перемішування було встановлено на 500 об/хв, рН підтримували на рівні 5,5, використовуючи 3 М NaOH, аерація становила 1 vvm і температура становила 35 °С під час росту, а при продукуванні ліпідів її знижували до 28 °С.

Таблиця 5:

Склад середовища для росту

Компоненти середовища	Концентрація (г/л)
Геміцелюлозні цукри	20
Екстракт дріжджів	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
MgCl * 6 H ₂ O	1,5
K ₂ HPO ₄	0,8
KH ₂ PO ₄	1,5
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,3

- Після інокуляції знадобилося приблизно 30 год. до початку активного росту грибка. Під час культивування, розчин геміцелюлози додавали малими партіями і після 95 год. культивування матеріал замінювали на целюлозний гідролізат. Під час культивування загалом додавали 236 г геміцелюлози та 484 г гідролізату целюлози. Частина dodаних цукрів наприкінці ферментації залишалася невикористаною. Через 167 год., коли культивування завершувалося, утворювалося 16 г/л біомаси, з яких 43 % складали ліпіди (Фігура 1). Можна зробити висновок, що продукування мікробної олії з геміцелюлозних та целюлозних цукрів пшеничної соломи було успішним. На початку ферментації фенольна концентрація становила 4 г/л, а наприкінці - 6 г/л (розрахунок на основі первісної кількості геміцелюлози). Таким чином, також можна твердити, що ріст грибків та ефективне продукування ліпідів досягали незважаючи на високу концентрацію інгібіторів.

- Приклад 4 - Ріст забруднюючих бактерій на геміцелюлозному розчині з вмістом фенолу
- Експерименти здійснювали з бактеріями *Bacillus subtilis* та *Pseudomonas fluorescens*.
- Основні компоненти середовища представлено у таблиці 6. Усі вони містили ці основні поживні речовини та розчин геміцелюлози з вмістом фенольних сполук, таким чином, що кінцева концентрація фенолів становила 0, 1, 2 та 3 г/л. У культивуванні застосовували аутогідролізну рідину С (розчин геміцелюлози), і вона містила 160 г/л цукрів згідно з аналізом шляхом HPLC, DW 460 г/л та 33 г/л фенолів згідно з аналізом з застосуванням способу Фоліна-Чокальтеу (Waterhouse, 2002).

Таблиця 6:

Склад середовища для росту

	г/л
глюкоза	20
солодовий екстракт	30
пептон	3

Середовище приготувляли, використовуючи водопровідну воду.

- Аутогідролізну рідину С (розчин геміцелюлози) додавали таким чином, щоб концентрація фенолів становила 0, 1, 2 та 3 г/л. Після цього рівень рН середовищ доводили до 6,5, використовуючи 3 М NaOH. Середовище розподіляли по 50 мл партіях у 250 мл колбах Ерленмеєра. Середовища стерилізували в автоклаві 121 С 15 хв. Після охолодження кожену колбу інокулювали, використовуючи 0,5 мл попередньо культивованої суспензії бактерій. Для кожної концентрації здійснювали паралельне культивування. Культури інкубували зі збовтуванням при 250 об/хв і при 28 °С протягом 5 днів. Ріст спостерігали щодня за допомогою мікроскопа і наприкінці культивування визначали вміст глюкози. Зразки концентрації цукру приготувляли шляхом центрифугування біомаси та розведення супернатанту у 10 разів дистильованою водою, і здійснювали HPLC-аналіз.

Результати:

- На основі мікроскопічних спостережень можна побачити, що обидві бактерії росли лише у колбах, які не містили фенолів. Наприкінці культивування усі цукри були витрачені лише у колбах, які не містили фенолів. У колбах, які містили феноли, була присутньою така сама кількість цукрів, що й на початку. Можна дійти висновку, що навіть при низьких концентраціях фенольні сполуки інгібують ефективність росту багатьох забруднюючих бактерій. Можна дійти висновку, що ріст забруднюючих бактерій може інгібуватися або уникатися через застосування лігноцелюлозних гідролізатів, які містять інгібіторні сполуки, такі, як фенольні сполуки, у концентраціях, які не викликають значного інгібування росту олійних дріжджів та нитчастих грибів (приклади 2, 3 та 6).

Приклад 5 – Контроль над забрудненням за допомогою фенольних сполук та швидкої теплової обробки

- Експерименти здійснювали, використовуючи продукуючий ліпід грибовий штам *A. oryzae*. Зі спорогенного гриба, вирощуваного на PDA-планшетах, приготувляли суспензію спор шляхом додавання 12 мл стерильної води і спори зіскрібали з застосуванням мікробіологічної петлі у рідину. Використовували 0,5 мл суспензії спор для інокуляції у кожену колбу. Склад середовища представлено у таблиці 9.

- Рідину від аутогідролізу з вмістом фенолів, аутогідролізну рідину А (розчин геміцелюлози), додавали таким чином, щоб кінцева концентрація у середовищах становила 3,5 г/л. Після цього рівень рН середовищ доводили до 6,5, використовуючи 3 М NaOH. Середовище розподіляли по 50 мл партіях у 250 мл колбах Ерленмеєра. Екстракт дріжджів у даному разі використовували як джерело для звичайних забруднюючих мікробів.

Таблиця 9:

Склад середовища для росту

	г/л
Глюкоза	40
Феноли	3,5
Екстракт дріжджів	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,2

Половину середовищ, приготувлених у такий спосіб, швидко нагрівали до 80 °С, а потім охолоджували. Для решти середовищ теплову обробку не здійснювали. Половину колб, які піддавали різним типам обробки, інокулювали 0,5 мл суспензії спор *A. oryzae*. Іншу половину

колб залишали неінокульованою. Також приготувляли дві колби вищеописаного середовища без додавання фенолів. Його нагрівали до 80 °C і інокульовали як інші культури. Усі культури інкубували при 28 °C зі збовтуванням при 160 об/хв протягом 7 днів. Ріст мікробів перевіряли щодня за допомогою мікроскопа.

5 Результати:

Після 1 дня інкубації спостерігали, що грибок ріс в усіх середовища, які інокульовали суспензією спор. У колбах, які не піддавали тепловій обробці спорами і які не містили фенолів, спостерігалася помітна кількість різних забруднюючих бактерій та дріжджів. Жодне з середовищ, які містили феноли, не було забрудненим. Після 2 днів інкубації у колбах, які не
10 були інокульовані або піддані тепловій обробці, почали рости забруднюючі дріжджі. Наприкінці культивування грибок добре ріс в усіх колбах, інокульованих спорами. Серед них не було виявлено забруднюючих мікробів. В інокульованих та не підданих тепловій обробці колбах також виявляли бактеріальне забруднення, додатково до вищезгаданих дріжджів. Натомість колби, які не містили інокуляту, але піддавалися тепловій обробці, ріст до кінця експериментів
15 не починався.

На основі цих результатів виявляється, що тепла обробка при 80 °C разом з додаванням фенольних сполук дозволяє захищати культури на основі геміцелюлози від найпоширеніших забруднюючих мікробів. З іншого боку, слід зазначити, що без фенолів середовище для росту за відсутності теплової обробки легко забруднюється, тому з гігієнічної точки зору вимагаються
20 обидві операції: додавання фенольних сполук та легка тепла обробка.

Приклад 6 - Продуктування мікробної олії на геміцелюлозних цукрах

Експерименти здійснювали, використовуючи продукуючий ліпід грибовий штам *A.oryzae*. Зі спорогенного гриба, вирощуваного на PDA-планшетах, приготувляли суспензію спор шляхом додавання 12 мл стерильної води і спори зіскрібали з застосуванням мікробіологічної петлі у
25 рідину. Для інокуляції 6 колб використовували 24 мл суспензії спор. Склад середовища представлено у таблиці 10. Інокульовані колби інкубували при 30 °C зі збовтуванням при 160 об/хв протягом 1 дня, а потім застосовували для інокуляції у біореакторі.

Таблиця 10:

Склад середовища для інокуляції, з
установленням pH 5,5.

	г/л
Геміцелюлозні цукри	40
Екстракт дріжджів	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,2

Використовували аутогідролізну рідину D (яка містила геміцелюлозні цукри, частково в олігомерній формі), і вона містила 4,2 г/л фенольних сполук згідно з аналізом з застосуванням способу Фоліна-Чокальтеу (Waterhouse, 2002). Культивування здійснювали у 5 л біореакторі Biostat B plus в об'ємі 3 л, і в цей час перемішування було встановлено на 400 об/хв, pH підтримували на рівні 5,5 з використанням 3 M NaOH, аерація становила 1 vvm, і температура
35 становила 30 °C. Склад середовища представлено у таблиці 11.

Таблиця 11:

Склад ферментаційного середовища

Компоненти середовища	Концентрація (г/л)
Геміцелюлозні цукри	60
Екстракт дріжджів	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgCl * 6 H ₂ O	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,2

Результати:

- Під час культивування малими партіями додавали геміцелюлозний розчин. Загалом додавали 150 г геміцелюлози. Частина доданих цукрів наприкінці ферментації залишалася невикористаною. Через 142 год., по закінченню культивування, утворювалося 14 г/л біомаси, з яких 21 % складали ліпіди. Можна дійти висновку, що продукування мікробної олії з геміцелюлозних цукрів пшениці (частково в олігомерній формі) було успішним. При ферментації концентрація фенольних сполук становила 2,8 г/л. Таким чином, також можна твердити, що ріст грибків та продукування ліпідів були можливими, незважаючи на високу концентрацію інгібіторів.

Приклад 7 - Вплив фурфуролу на ріст мікробів

Умови культивування

- Два грибкові штами *Aspergillus oryzae* ТКК-4 та *Mortierella isabellina* ТКК-1 і один дріжджовий штам *Lipomyces starkeyi* ТКК-1 культивували у колбах у стандартному середовищі (Таблиця 12) (з додаванням фурфуролу. Мікроорганізми вирощували протягом 6 днів при 28 °C та 160 об/хв (для грибків) та 250 об/хв (для дріжджів). Целюлозу додавали для сприяння зростанню грибка з кращою морфологією. До середовища додавали фурфурол у різній кількості (0-4 г/л) і спостерігали ріст мікроорганізмів.

Таблиця 12.

Компоненти середовища.

Компонент середовища	г/л
Солодовий екстракт	30
Пептон	3
Моногідрат декстрази	20
Целюлоза	2

Результати

- Після одного тижня *A. oryzae* ТКК-4 ріс у 0,5 г/л фурфуролу, але більш високі концентрації ($\geq 0,75$ г/л) повністю інгібували ріст. *M. isabellina* ТКК-1 не ріс у ≥ 1 г/л фурфуролу, але через 4-6 днів спостерігався певний ріст у 0,8 г/л. *L. starkeyi* ТКК-1 був найбільш толерантним до фурфуролу. Він ріс у 1,2 г/л фурфуролу після кількох днів. Інгібуюча концентрація становила $> 1,8$ г/л. У таблиці 13 показано значення концентрації сухої маси для культивування у колбах з концентрацією фурфуролу 0-1,2 г/л.

Таблиця 13

Концентрація сухої маси, яку вимірювали після 6 днів культивування у грибах *A. oryzae* ТКК-4 та *M. isabellina* ТКК-1 та дріжджах *L. starkeyi* ТКК-1 при концентрації фурфуролу 0-1,2 г/л.

	<i>A. oryzae</i> ТКК-4	<i>M. isabellina</i> ТКК-1	<i>L. starkeyi</i> ТКК-1
Фурфурол (г/л)	DW (г/л)		
0	18,02	16,17	14,46
0,1	18,18		
0,2	16,54	7,02	
0,3	13,53		
0,4	11,58	13,80	
0,6		14,96	14,79
0,8		9,28	
1,2			14,39

Приклад 8 - Аутогідроліз (з попередньо відрегульованим рН) пшеничної соломи

- Суспензію приготували шляхом змішування 20 г пшеничної соломи, попередньо перемеленої для проходження крізь 1 мм сито, та 180 г води. Суспензію доводили оцтовою кислотою до рН 4,5. Суспензію переносили до автоклавного реактора, який потім неізотермічно нагрівали за допомогою нагрівальної сорочки до температури від 170 °С до 200 °С з безперервним перемішуванням. Дані температури під час нагрівання записували і використовували для розрахунку ступеня аутогідролізу (Рівн. 1). Реактор охолоджували до приблизно 50 °С і суспензію вручну видобували для фільтрації. Рідку фракцію відокремлювали від твердої фракції і фурфурол та гідроксиметилфурфурол (HMF) у рідкій фракції вимірювали з застосуванням HPLC. Загальну концентрацію цукру (г/л) у рідкій фракції визначали після гідролізу розведеною кислотою, що перетворює олігомерні та полімерні цукри на моносахариди. Тверду фракцію промивали водою (0,5 дм³) і пресували.
- Одержаний твердий залишок зважували, брали зразок для визначення сухої речовини і вихід твердого залишку (%) розраховували як масове співвідношення твердого залишку з пшеничною соломою, зваженою для аутогідролізуної обробки (100 %*г сухої пшеничної соломи / г сухого твердого залишку). Розчинні фенольні речовини у рідині визначали з застосуванням способу Фоліна-Чокальтеу з гваяколом як стандартом.
- Результати, показані на Фігурі 2 та Фігурі 3, є зведеними результатами. Вихід твердого залишку знижувався зі збільшенням ступеня аутогідролізу і становив 67 % при найвищому ступені (Log(R0)=4,4) (Фіг. 2). Концентрація моносахаридних цукрів у рідкій фракції спочатку збільшувалася, а потім зменшувалася зі збільшенням ступеня аутогідролізу. Максимальна концентрація цукру (23,1 г/л) досягалася, коли ступінь аутогідролізу становив Log(R0)=3,8. Поза межами цього ступеня аутогідролізу концентрація цукру в рідкій фракції різко знижувалася, а концентрація фурфуролу та HMF раптово збільшувалася, досягаючи 4,8 г/л та 0,3 г/л, відповідно. На відміну від раптового утворення фурфуролу та HMF, концентрація розчинних фенолів поступово збільшувалася з 0,5 г/л до 2,0 г/л зі збільшенням ступеня аутогідролізу.
- Цей приклад показує, що оптимальні умови аутогідролізу стосовно ступеня аутогідролізу (Log(R0)) можуть бути вибрані таким чином, щоб уникнути надмірного утворення фурфуролу, HMF та розчинних фенолів при забезпеченні максимальної концентрації моносахаридів у рідкій фракції.

Бібліографія

- Suutari, M., Liukkonen, K. ja Laakso, S., Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids, J. Gen. Microbiol. 136 (1990) 1496-1474.
- Waterhouse AL. 2002. Determination of total phenolics. In: Wrolstad RE, Acree TE, An H, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Sporns P, editors. Current protocols in food analytical chemistry. 1st ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. p 11.1.1-11.1.8.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб виробництва ліпідів, який включає такі етапи:

- забезпечення середовища для культивування, яке містить лігноцелюлозний гідролізат,
- забезпечення ферментативного бульйону шляхом інокуляції середовища для культивування

(i) першим мікроорганізмом, причому згаданий перший мікроорганізм є олійним мікроорганізмом, який здатний накопичувати внутрішньоклітинні ліпіди таким чином, що ліпіди складають принаймні 15 мас. % від загальної біомаси (на суху масу клітин) мікроорганізму при культивуванні у придатних умовах,

5 (iii) інкубацію згаданого середовища, інокульованого згаданим першим мікроорганізмом, здійснюють в аеробних умовах, що забезпечує можливість накопичення ліпідів, причому згаданий ферментативний бульйон містить принаймні один інгібітор росту мікроорганізмів, вибраний з групи, яка складається з фенольних сполук, органічних кислот, фурфуролу та гідроксиметилфурфуролу, і

10 причому згаданий ферментативний бульйон додатково містить другий неолійний мікроорганізм, здатність якого накопичувати внутрішньоклітинні ліпіди є нижчою за 15 мас. % від загальної біомаси (на суху масу клітин) при культивуванні у придатних умовах,

15 причому згаданий принаймні один інгібітор росту мікроорганізмів присутній у згаданому ферментативному бульйоні в концентрації у діапазоні, який забезпечує здатність першого мікроорганізму до проліферації та/або продукування олії і інгібує проліферацію згаданого другого мікроорганізму принаймні на 20 %, і

причому присутність інгібітора росту мікроорганізмів інгібує проліферацію згаданого другого мікроорганізму і сприяє, щоб проліферація згаданого першого мікроорганізму переважала над згаданим другим мікроорганізмом.

20 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що згаданий другий мікроорганізм є присутнім у середовищі для культивування, що забезпечується на етапі (i), або забруднює ферментативний бульйон на етапі (ii) або (iii).

3. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що також включає етап додавання згаданого принаймні одного інгібітора росту мікроорганізмів або регулювання концентрації згаданого принаймні одного інгібітора росту мікроорганізмів у ферментативному бульйоні.

25 4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що принаймні один інгібітор росту мікроорганізмів являє собою групу фенольних сполук, яку вимірюють як концентрацію загальних фенолів на одиницю об'єму ферментативного бульйону.

5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що рівень згаданих фенольних сполук у згаданому ферментативному бульйоні становить принаймні 1 г/л.

30 6. Спосіб за п. 4 або 5, який **відрізняється** тим, що рівень згаданих фенольних сполук у згаданому ферментативному бульйоні становить від 1 до 7 г/л або більше.

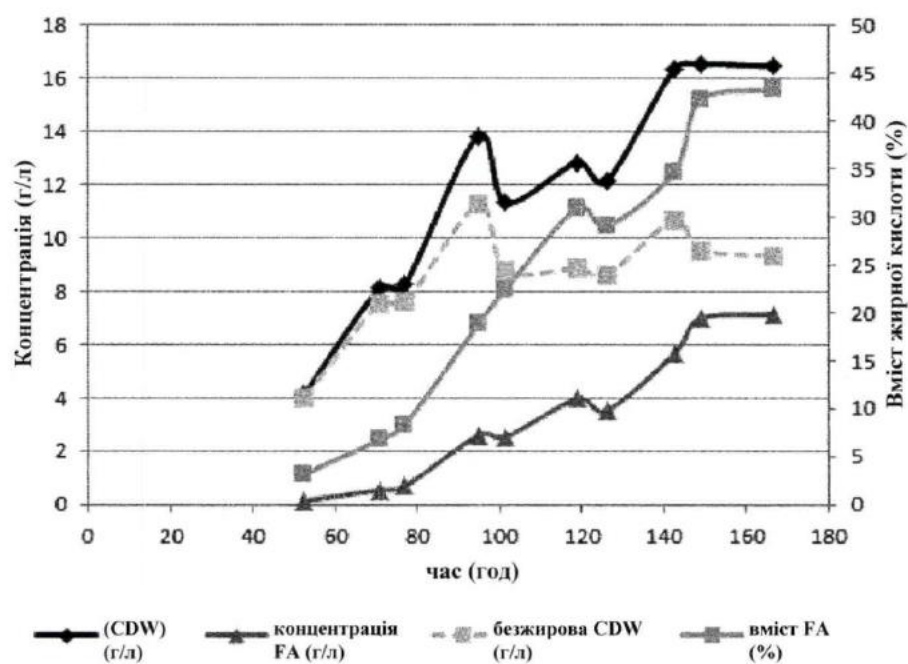
7. Спосіб за будь-яким з пп. 4-6, який **відрізняється** тим, що рівень згаданих фенольних сполук у згаданому ферментативному бульйоні знаходиться у діапазоні від 1 до 5 г/л, переважно у діапазоні від 1 до 3 г/л.

35 8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що згаданий перший мікроорганізм вибирають з нитчастих грибів, дріжджів, бактерій або водоростей.

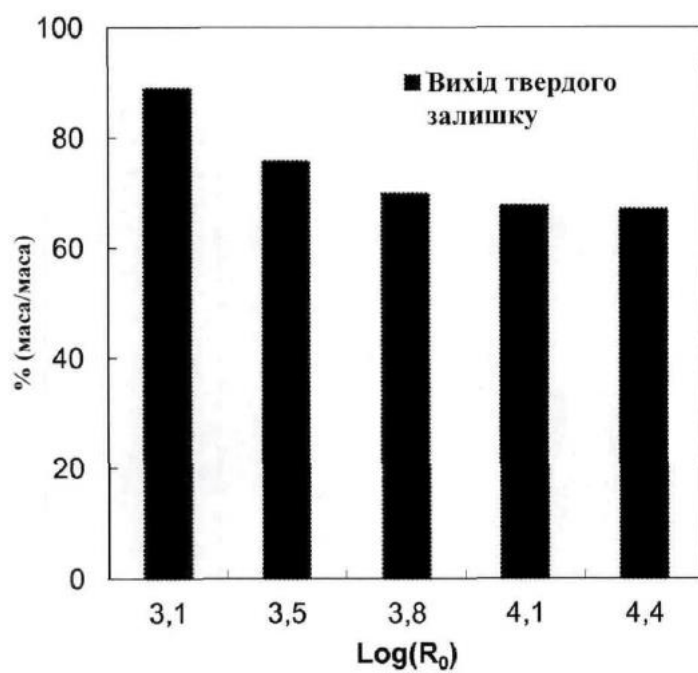
9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що згаданий перший мікроорганізм вибирають з *Mortierella*, *Aspergillus*, *Lipomyces*, *Rhodospiridium* або *Cryptococcus*.

40 10. Спосіб за будь-яким з пп. 2-9, який **відрізняється** тим, що згаданий другий мікроорганізм є неолійним і вибраним з бактерій, дріжджів, нитчастих грибів або мікрободоростей.

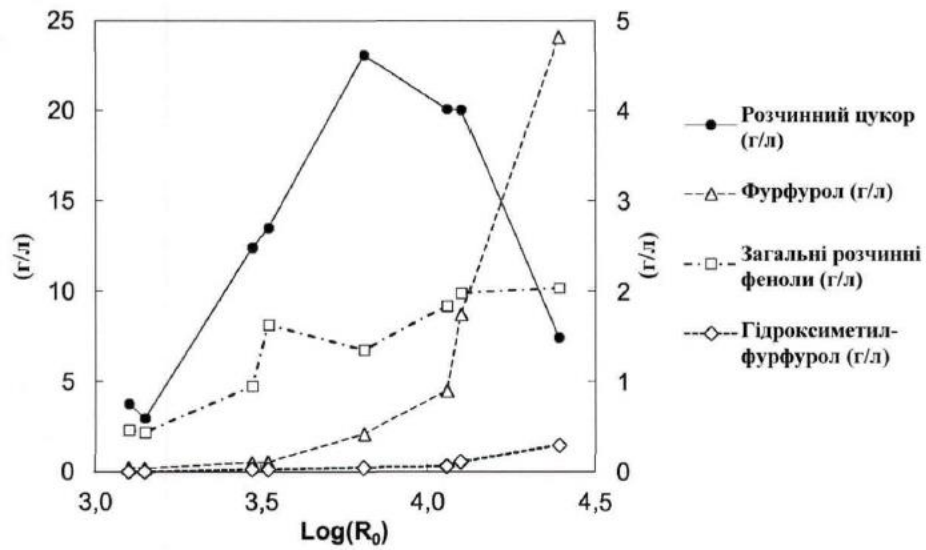
11. Спосіб за будь-яким з пп. 2-10, який **відрізняється** тим, що згаданий другий мікроорганізм є бактерією, вибраною з *Bacillus* spp. та *Pseudomonas* spp.



ФІГ. 1



ФІГ. 2



ФІГ. 3

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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