



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2011138459/10, 19.02.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
20.02.2009 US 61/154,235;
10.06.2009 US 61/185,865;
12.02.2010 US 61/304,219

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2013 Бюл. № 9

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 20.09.2011

(86) Заявка РСТ:
US 2010/024768 (19.02.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/096673 (26.08.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО
"Юридическая фирма Городиский и Партнеры"

(71) Заявитель(и):

ДАНИСКО ЮЭс ИНК. (US)

(72) Автор(ы):

**ХУАН Том Тао (US),
КЕЛЛИ Арон (US),
МАКЛАФЛИН Джон (US)**(54) **КОМПОЗИЦИИ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ БУЛЬОНОВ**

(57) Формула изобретения

1. Способ получения композиции ферментационного бульона, включающий инкубацию первой смеси, содержащей

(а) один или несколько ферментационных бульонов,

(b) первый компонент органической кислоты, содержащий по меньшей мере одну органическую кислоту из 1-5 атомов углерода и/или ее соль в количестве от 0,1% до 15 мас.% указанной смеси, и

(с) второй компонент органической кислоты, содержащий по меньшей мере одну органическую кислоту из 6 или более атомов углерода и/или ее соль, в количестве от 0,025% до 5 мас.% указанной смеси,

в течение периода времени и в условиях, которые приводят к снижению количества жизнеспособных клеток, составляющему по меньшей мере 4 log, в указанных одном или нескольких ферментационных бульонах, тем самым получая композицию ферментационного бульона.

2. Способ по п.1, где указанный первый компонент органической кислоты присутствует в количестве от 0,2% до 1%, от 0,2% до 0,5%, от 0,1% до 10%, от 0,25% до 5% или от 0,3% до 3 мас.% указанной первой смеси.

3. Способ по п.1, где указанный второй компонент органической кислоты присутствует в количестве от 0,04% до 3%, от 0,2% до 0,5%, от 0,1% до 1%, от 0,25% до

5% или от 0,3% до 3 мас.% указанной первой смеси.

4. Способ по п.1, где указанный период времени составляет от 8 ч до 36 ч.

5. Способ по п.4, где указанный период времени составляет от 20 ч до 28 ч.

6. Способ по п.1, где указанные условия включают температуру от 20°C до 50°C.

7. Способ по п.6, где указанные условия включают температуру от 25°C до 40°C.

8. Способ по п.7, где указанные условия включают температуру от 28°C до 33°C.

9. Способ по п.1, где указанные условия включают рН от 3,5 до 5.

10. Способ по п.9, где указанные условия включают рН от 4 до 4,7.

11. Способ по п.10, где указанные условия включают рН от 4,2 до 4,5.

12. Способ по п.1, где указанную инкубацию проводят в течение периода времени и в условиях, которые приводят к снижению количества жизнеспособных клеток в указанном одном или нескольких ферментационных бульонах, составляющему по меньшей мере 5 log, 6 log, 7 log или 8 log.

13. Способ по п.1, где указанное снижение жизнеспособных клеток по меньшей мере в 0,5 раз, по меньшей мере в 1 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз превышает снижение во второй смеси, подвергнутой указанным условиям, где указанная вторая смесь содержит только один из указанного первого компонента органической кислоты и указанного второго компонента органической кислоты, в количестве вплоть до суммы массовых процентов первого и второго компонентов органической кислоты в указанной первой смеси.

14. Способ по п.1, где указанные клетки представляют собой клетки грибов.

15. Способ по п.14, где клетки грибов представляют собой клетки нитчатых грибов.

16. Способ по п.15, где клетки нитчатых грибов представляют собой клетки рода *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Humicola*, *Chrysosporium* или *Neurospora*.

17. Способ по п.1, где первый компонент органической кислоты содержит уксусную кислоту, соль уксусной кислоты, муравьиную кислоту, соль муравьиной кислоты, пропионовую кислоту, соль пропионовой кислоты или смесь двух или более из указанных выше или состоит из них.

18. Способ по п.17, где первый компонент органической кислоты содержит уксусную кислоту и/или ее соль или состоит из них.

19. Способ по п.1, где второй компонент органической кислоты содержит бензойную кислоту, соль бензойной кислоты, циклогексанкарбоновую кислоту, соль циклогексанкарбоновой кислоты, 4-метилвалериановую кислоту, соль 4-метилвалериановой кислоты, фенилуксусную кислоту, соль фенилуксусной кислоты или смесь двух или более из указанных выше или состоит из них.

20. Способ по п.19, где второй компонент органической кислоты содержит бензойную кислоту и/или ее соль или состоит из них.

21. Способ по п.1, где указанный первый компонент органической кислоты содержит натриевую, калиевую, кальциевую или магниевую соль указанной органической кислоты из 1-5 атомов углерода и/или где указанный второй компонент органической кислоты содержит натриевую, калиевую, кальциевую или магниевую соль указанной органической кислоты из 6 или более атомов углерода.

22. Способ по п.1, где указанный первый компонент органической кислоты содержит уксусную кислоту в концентрации 0,2%-0,4 мас.% и второй компонент органической кислоты содержит бензоат натрия в концентрации 0,2%-0,4 мас.%.

23. Способ по п.22, где указанный период времени составляет 24 ч, указанные условия включают температуру 40°C и указанное значение рН составляет от 4 до 4,6.

24. Способ по п.1, где по меньшей мере один из указанных одного или нескольких ферментационных бульонов содержит один или несколько белков, секретируемых указанными клетками.

25. Способ по п.24, где указанный по меньшей мере один из указанных одного или нескольких белков экспрессируется рекомбинантно указанными клетками.

26. Способ по п.24, где по меньшей мере один из указанных одного или нескольких белков представляет собой фермент.

27. Способ по п.26, где указанный фермент представляет собой экзоглюканазу, эндоглюканазу, гемицеллюлазу или β -глюкозидазу.

28. Способ по п.24, где по меньшей мере один из указанных одного или нескольких ферментационных бульонов содержит множество ферментов, экспрессируемых рекомбинантно и секретируемых клетками.

29. Способ по п.28, где указанное множество ферментов представляет собой каждый из экзоглюканазы, эндоглюканазы, гемицеллюлазы или β -глюкозидазы.

30. Способ по п.1, где указанные условия приводят к составу ферментационного бульона, имеющему по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% ферментативной активности указанного одного или нескольких ферментационных бульонов.

31. Способ по п.1, где белки составляют 5-15 мас.% от указанной первой смеси.

32. Способ по п.1, дополнительно включающий стадию добавления рН-корректирующего средства в указанную первую смесь в ходе указанного периода инкубации.

33. Способ по п.32, где указанное рН-корректирующее средство представляет собой фосфорную кислоту.

34. Способ по п.32, где указанное рН-корректирующее средство представляет собой серную кислоту.

35. Способ по п.32, где указанное рН-корректирующее средство представляет собой гидроксид натрия.

36. Способ по п.1, где указанная первая смесь дополнительно содержит одно или несколько противомикробных средств.

37. Способ по п.36, где указанные одно или несколько противомикробных средств присутствуют в количестве от 0,0005 до 0,05 мас.% указанной первой смеси.

38. Способ по п.37, где указанные одно или несколько противомикробных средств присутствуют в количестве от 0,001 до 0,025 мас.% указанной первой смеси.

39. Способ по п.36, где противомикробное средство содержит экстракт хмеля, содержащий изо-альфа-кислоты, тетра-изо-альфа-кислоты и/или бета-кислоты.

40. Способ по п.1, дополнительно включающий получение указанной первой смеси перед указанной стадией инкубации.

41. Способ по п.40, где указанную первую смесь получают с помощью процесса, включающего комбинирование одного или нескольких ферментационных бульонов по меньшей мере с одной органической кислотой из 1-5 атомов углерода и/или ее солью, по меньшей мере одной органической кислотой из 6 или более атомов углерода и/или солью и, необязательно, одним или несколькими дополнительными реагентами.

42. Способ по п.41, где указанные один или несколько дополнительных реагентов содержат рН-корректирующее средство и/или противомикробное средство.

43. Композиция ферментационного бульона, полученная или получаемая способом по п.1.

44. Композиция ферментационного бульона по п.43, которая содержит один или несколько внеклеточных ферментов, выбранных из экзоглюканазы, эндоглюканазы, гемицеллюлазы и β -глюкозидазы.

45. Композиция ферментационного бульона по п.43, которая имеет от 2200 до 2800 СМС Ед/г активности эндоглюканазы и от 525 до 775 рNPG Ед/г активности β -

глюкозидазы.

46. Композиция ферментационного бульона по п.43, которая имеет от 2200 до 3200 СМС Ед/г активности эндоглюканазы, от 300 до 800 рNPG Ед/г активности β-глюкозидазы и от 2000 до 5000 АВХ Ед/г активности ксиланазы.

47. Композиция, содержащая (а) один или несколько ферментационных бульонов, содержащих клетки; (б) первый компонент органической кислоты, содержащий по меньшей мере одну органическую кислоту из 1-5 атомов углерода и/или ее соль в количестве от 0,2 до 1,5 мас.% указанной композиции, (с) второй компонент органической кислоты, содержащий по меньшей мере одну органическую кислоту из 6 или более атомов углерода и/или ее соль в количестве от 0,04 до 0,6 мас.% указанной композиции.

48. Композиция по п.47, где указанный первый компонент органической кислоты присутствует в количестве от 0,2% до 1%, от 0,2% до 0,5%, от 0,1% до 10%, от 0,25% до 5% или от 0,3% до 3 мас.% указанной композиции.

49. Композиция по п.47, где указанный второй компонент органической кислоты присутствует в количестве от 0,04% до 3%, от 0,2% до 0,5%, от 0,1% до 1%, от 0,25% до 5% или от 0,3% до 3 мас.% указанной композиции.

50. Композиция по п.47, где указанные клетки являются преимущественно или полностью нежизнеспособными клетками.

51. Композиция по п.50, где если в указанной композиции присутствуют жизнеспособные клетки, тогда соотношение нежизнеспособных клеток и жизнеспособных клеток в указанной композиции составляет по меньшей мере 10:1, по меньшей мере 50:1, по меньшей мере 100:1, по меньшей мере 1000:1, по меньшей мере 10000:1, по меньшей мере 100000:1 или по меньшей мере 1000000:1.

52. Композиция по п.47, которая имеет рН от 3,5 до 5.

53. Композиция по п.52, которая имеет рН от 4 до 4,7.

54. Композиция по п.53, которая имеет рН от 4,2 до 4,5.

55. Композиция по п.47, где указанные клетки содержат клетки грибов.

56. Композиция по п.55, где указанные клетки грибов представляют собой клетки нитчатых грибов.

57. Композиция по п.56, где указанные клетки нитчатых грибов представляют собой клетки рода *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Humicola*, *Chrysosporium* или *Neurospora*.

58. Композиция по п.47, где первый компонент органической кислоты содержит уксусную кислоту, соль уксусной кислоты, муравьиную кислоту, соль муравьиной кислоты, пропионовую кислоту, соль пропионовой кислоты или смесь двух или более из указанных выше или состоит из них.

59. Композиция по п.58, где первый компонент органической кислоты содержит уксусную кислоту и/или ее соль или состоит из них.

60. Композиция по п.47, где второй компонент органической кислоты содержит бензойную кислоту, соль бензойной кислоты, циклогексанкарбоновую кислоту, соль циклогексанкарбоновой кислоты, 4-метилвалериановую кислоту, соль 4-метилвалериановой кислоты, фенилуксусную кислоту, соль фенилуксусной кислоты или смесь двух или более из указанных выше или состоит из них.

61. Композиция по п.60, где второй компонент органической кислоты содержит бензойную кислоту и/или ее соль или состоит из них.

62. Композиция по п.47, где указанный первый компонент органической кислоты содержит натриевую, калиевую, кальциевую или магниевую соль указанной органической кислоты из 1-5 атомов углерода и/или где указанный второй компонент органической кислоты содержит натриевую, калиевую, кальциевую или магниевую соль указанной органической кислоты из 6 или более атомов углерода.

А
9
5
4
8
3
1
1
1
2
0
1
1
3
8
4
5
9
А
R
U

RU
2011138459
А

63. Композиция по п.47, где указанный первый компонент органической кислоты содержит уксусную кислоту в концентрации 0,2%-0,4 мас.% и второй компонент органической кислоты содержит бензоат натрия в концентрации 0,2%-0,4 мас.%.

64. Композиция по п.47, которая содержит один или несколько белков, секретируемых указанными клетками.

65. Композиция по п.64, где указанный по меньшей мере один из указанных одного или нескольких белков экспрессируется рекомбинантно указанными клетками.

66. Композиция по п.64, где по меньшей мере один из указанных одного или нескольких белков представляет собой фермент.

67. Композиция по п.66, где указанный фермент представляет собой экзогликоканазу, эндогликоканазу, гемицеллюлазу или β -глюкозидазу.

68. Композиция по п.47, которая содержит множество ферментов, экспрессируемых рекомбинантно и секретируемых клетками.

69. Композиция по п.68, где указанное множество ферментов представляет собой каждый из экзогликоканазы, эндогликоканазы, гемицеллюлазы или β -глюкозидазы.

70. Композиция по п.47, где белки составляют 5-15 мас.% от указанной первой смеси.

71. Композиция по п.47, которая дополнительно содержит одно или несколько противомикробных средств.

72. Композиция по п.71, где указанные одно или несколько противомикробных средств присутствуют в количестве от 0,0005 до 0,05 мас.% указанной композиции.

73. Композиция по п.72, где указанные одно или несколько противомикробных средств присутствуют в количестве от 0,001 до 0,025 мас.% указанной композиции.

74. Композиция по п.71, где противомикробное средство содержит экстракт хмеля, содержащий изо-альфа-кислоты, тетра-изо-альфа-кислоты и/или бета-кислоты.

75. Набор, содержащий

(a) упаковку и

(b) (i) композицию ферментационного бульона по п.43 или (ii) композицию по п.47.