

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201692347** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.04.28

(22) Дата подачи заявки
2015.05.20

(51) Int. Cl. **C12P 19/02** (2006.01)
C12P 7/02 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12P 17/10 (2006.01)
C12P 19/28 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

(54) СПОСОБ ГИДРОЛИЗА ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО МАТЕРИАЛА, ГДЕ ГИДРОЛИЗАТ ИСПОЛЬЗУЮТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОЙ ГИДРОЛАЗЫ

(31) **14001784.9**

(32) **2014.05.21**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2015/061072**

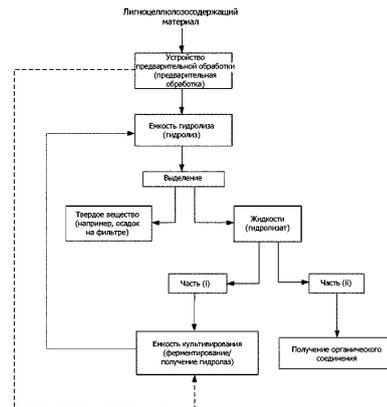
(87) **WO 2015/177189 2015.11.26**

(71) Заявитель:
**КЛАРИАНТ ИНТЕРНЭШНЛ ЛТД.
(CN)**

(72) Изобретатель:
**Цаврель Михаэль, Денневальд
Даниелле, Баргх Йорг, Маркманн
Хеннинг (DE)**

(74) Представитель:
**Саломатина И.С., Фелицына С.Б.
(RU)**

(57) Настоящее изобретение направлено на способ самодостаточного гидролиза лигноцеллюлозного материала. В одном дополнительном аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения органического продукта и органический продукт, полученный в соответствии с данным способом.



201692347 A1

201692347 A1

**СПОСОБ ГИДРОЛИЗА ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО МАТЕРИАЛА,
ГДЕ ГИДРОЛИЗАТ ИСПОЛЬЗУЮТ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОЙ ГИДРОЛАЗЫ**

Настоящее изобретение направлено на способ самостоятельного гидролиза лигноцеллюлозного материала. В одном дополнительном аспекте настоящее изобретение направлено на способ получения органического продукта и органический продукт, полученный в соответствии с данным способом.

Вследствие ограниченности ресурсов сырой нефти и наличия потребности в уменьшении выбросов CO₂ в химической промышленности проводится поиск более экологически безопасных путей производства при изготовлении товарных химических реагентов, таких как жидкие топлива и продукция базовой химии. Часть данной стратегии фокусируется на превращении лигноцеллюлозной биомассы в разнообразные химические реагенты или топлива, такие как этанол. Лигноцеллюлозная биомасса содержит целлюлозу (~ 25-40% (масс./масс.) при расчете на сухое вещество), гемицеллюлозу (~ 15-25% (масс./масс.) при расчете на сухое вещество) и лигнин (~ 15-30% (масс./масс.) при расчете на сухое вещество) в качестве основных компонентов и незначительные количества других углеводов, восков, белков и неорганических соединений. В числе форм биомассы растительного происхождения лигноцеллюлозная биомасса, произведенная из любых потоков отходов из лесного и сельского хозяйства, таких как древесные отходы и солома зерновых злаков, является в особенности хорошо подходящей для использования при превращении в товарные химические реагенты и топлива вследствие своей доступности, низкой стоимости и экологически безвредного производства. В дополнение к этому анализы эксплуатационного ресурса производственных способов, использующих лигноцеллюлозное исходное сырье, указывают на уменьшенные выбросы парниковых газов в сопоставлении с тем, что имеет место для способов на основе другого исходного сырья.

Были описаны различные технологические опции, которые описывают превращение лигноцеллюлозной биомассы в этанол и другую продукцию базовой химии (Rejo et al., 2008). Для осуществления данных способов в промышленном масштабе в особенности желательным является перенос максимального количества энергии, углерода и массосодержания, имеющихся в возобновляемом исходном сырье, в конечные продукты. В настоящее время ни один из описанных способов превращения не осуществил этого в полной степени.

Примерами элементарных операций для биотехнологического превращения лигноцеллюлозного материала (например, соломы) в продукцию с добавленной стоимостью (например, этанол) являются: механическое удаление клейкого вещества и/или физико-химическая предварительная обработка, ферментативный гидролиз, ферментирование и извлечение продукта. Для установления максимальной эффективности способа обязательным является превращение максимального количества полисахаридов в растворимые сахара во время проведения операции в установке ферментативного гидролиза.

Что касается производства целлюлозного этанола в промышленном масштабе, то ключевое препятствие все еще заключается в издержках, связанных со стоимостью эффективного ферментативного гидролиза подвергнутой предварительной обработке лигноцеллюлозы при высоких концентрациях твердого вещества.

Таким образом, гидролиз целлюлозной фракции был определен в качестве одного из основных препятствий при превращении лигноцеллюлозы в этанол. В настоящее время основные узкие места представляют собой стоимость фермента и эксплуатационные характеристики, требуемые для эффективного гидролиза биомассы.

Разложение суспензии подвергнутой предварительной обработке биомассы на ферментируемые мономерные сахара может быть осуществлено в результате проведения гидролиза, катализируемого либо кислотой, либо ферментом. Ферментативный гидролиз является более селективным и менее энергозатратным по сравнению с сопоставимыми химическими методологиями (такими как на кислотной основе), что поэтому обеспечивает получение более благоприятных экономических параметров способа и потенциально более высокого выхода этанола во время ферментирования.

Подходящие для использования системы ферментов, которые превращают полимерные сахара, такие как целлюлоза и гемицеллюлоза, в мономерные гексозу (то есть глюкозу) и пентозу (то есть ксилозу), обычно включают активности целлюлазы, гемицеллюлазы и бета-глюкозидазы. Системы ферментов, включающие активности целлюлазы и бета-глюкозидазы, зачастую производят в погруженных в жидкую среду культурах плесени, например, видов *Trichoderma sp.* и/или *Aspergillus sp.*. Остаток биомассы плесени обычно отделяют от ферментативного бульона и отбрасывают. После этого ферментативный бульон концентрируют, стабилизируют и используют для составления рецептуры получающегося в результате ферментного продукта для транспортирования.

В соответствии с публикацией Kristensen et al. (2009) ферментативный гидролиз биомассы зачастую проводят при пониженном уровне содержания твердого вещества в

диапазоне 10-20% (масс./масс.). Уровень содержания твердого вещества, больший, чем 15% (масс./масс.), зачастую приводит к значительным потерям выходов мономерных сахаров. Данный эффект обуславливается проблемами, связанными с гомогенным перемешиванием суспензий, характеризующихся высоким уровнем содержания твердого вещества, что приводит к неравномерному распределению фермента. В дополнение к этому накопление конечных продуктов, подобных целлобиозе и глюкозе, высвобожденных во время ферментативного гидролиза, может приводить к собственному ингибированию активностей целлюлазы и бета-глюкозидазы (Xiao et al., 2004a).

В публикации Rao et al. (1985) указывают на использование совокупной суспензии плесневого ферментирования для эффективного гидролиза целлюлозных субстратов. Однако, для получения фермента использовали искусственные среды, которые не дают возможность подгонять получение гидролизного фермента к конкретному исходному сырью и/или опции предварительной обработки, и поэтому эффективность получения фермента является относительно низкой. Автор Tolan (Clean Techn Environ Policy 3 (2002) 339-345) описывает в «способе компании Iogen для получения этанола из целлюлозной биомассы» использование сырого бульона от гидролиза в качестве среды для получения фермента в целях экономии производственных затрат. Еще один недостаток способов раскрытых авторами Rao et al. и Tolan, заключается в ограничении секретированных ферментативных активностей, поскольку ничего не предпринимается для облегчения высвобождения несекреторных ферментов или ферментов, связанных с поверхностью клетки.

Вышеупомянутые обычные методики деструкции биомассы либо являются неэффективными, либо зависят от требующего времени и затрат добавления коммерческих отдельно полученных ферментов или смесей ферментов, которые являются надлежащими для деструкции конкретной биомассы. Кроме того, данные недостатки не преодолевает также и использование сырых суспензии или бульона, поскольку это не только не приводит к желательному получению необходимых сахаров для плесневого ферментирования, но также и неизбежно приведет к введению в способ ферментирования широкого спектра нежелательных ингибирующих и/или токсических веществ. Таким образом, преимущество использования дешевой среды ферментирования будет компенсироваться серьезным недостатком по эффективности в отношении получения фермента.

В рамках публикации EP 2 471 940 был описан эффективный способ гидролиза лигноцеллюлозы с интегрированным получением фермента. В данном способе среда для ферментного ферментирования состоит из высоких количеств суспендированного

твердого вещества. В целях дополнительного улучшения экономических параметров цель изобретения заключается в разработке способа гидролиза лигноцеллюлозы и ферментного ферментирования при использовании минимизированного количества суспендированного твердого вещества и ингибиторов, в то время как количество растворимых углеводов дополнительно увеличивается.

Поэтому цель настоящего изобретения заключается в предложении улучшенного высокоэффективного способа деструкции биомассы, такой как лигноцеллюлозная биомасса.

Как в настоящее время к своему удивлению обнаружили изобретатели настоящего изобретения, данная цель настоящего изобретения может быть достигнута при использовании способа самостоятельного ферментативного гидролиза лигноцеллюлозосодержащего материала, включающего стадии:

(a) проведения для лигноцеллюлозосодержащего материала предварительной обработки в устройстве предварительной обработки;

(b) введения подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала стадии a) в контакт с, по меньшей мере, одним ферментом, относящимся к классу гидролаз, в емкости гидролиза для получения гидролизата;

(c) выделения гидролизата и последующего разделения гидролизата на две части (i) и (ii), где часть (i) направляют в емкость культивирования;

(d) ферментирования части (i) гидролизата при использовании, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени и способного обеспечивать получение, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз;

и

(e) повторного направления подвергнутого ферментированию гидролизата стадии d) в емкость гидролиза стадии b);

где подвергнутый предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащий материал и/или гидролизат подвергают обработке для удаления, по меньшей мере, одного вещества, ингибирующего, по меньшей мере, один фермент и/или, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени.

Способ ферментативного гидролиза лигноцеллюлозосодержащего материала настоящего изобретения является в особенности выгодным, поскольку он является самостоятельным, но также и высокоэффективным, так как интегрирование гидролизата всего способа в рамках стадии получения фермента (d) будет делать возможными

экономичное получение и прямое интегрирование «по месту» максимального количества подходящих для использования гидролитических ферментов, приводя к получению максимального количества растворимых углеводов. Кроме того, удаление ингибирующих веществ во время, по меньшей мере, одной ступени способа будет делать возможным способ, который может осуществляться не только самодостаточным, но и непрерывным образом при высокой эффективности, поскольку получение гидролитического фермента не будет замедляться или ингибироваться нежелательными веществами, что приведет к получению дополнительных экономических преимуществ.

В рамках настоящего изобретения термин «лигноцеллюлозосодержащий материал» должен пониматься как включающий все типы материала, известного для специалистов в соответствующей области техники содержанием лигноцеллюлозы. Термины «лигноцеллюлозосодержащий материал», «лигноцеллюлозосодержащая биомасса», «лигноцеллюлозный материал» и «лигноцеллюлозная биомасса» в рамках настоящего изобретения должны пониматься как синонимы. В особенности предпочтительный лигноцеллюлозосодержащий материал, соответствующий настоящему изобретению, включает древесину, солому зерновых злаков и/или мякину, жмых, овсяную лузгу, просо, целлюлозу, первичную волокнистую массу (полученную из целлюлозной массы и от производства бумаги) и их смеси. Альтернативные источники или дополнительные компоненты могут включать один или несколько следующих далее компонентов: очищенная целлюлоза, целлюлозная масса, молочная сыворотка, мелассы или сахара, такие как глюкоза и лактоза. В одном предпочтительном варианте осуществления лигноцеллюлозосодержащий материал содержит, по меньшей мере, 25% (масс.), предпочтительно, по меньшей мере, 40% (масс.), более предпочтительно, по меньшей мере, 70% (масс.), еще более предпочтительно, по меньшей мере, 80% (масс.), а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 90% (масс.), лигноцеллюлозы. Необходимо понимать то, что лигноцеллюлозосодержащий материал также может содержать и другие соединения, такие как белковый материал, крахмал, сахара, такие как ферментируемые сахара и/или неферментируемые сахара.

В рамках настоящего изобретения термин «ферментативный гидролиз» должен пониматься как обозначение способа, где подходящие для использования ферменты превращают полимерные сахара, такие как целлюлоза и гемицеллюлоза, в мономерные гексозу (то есть глюкозу) и/или пентозу (то есть ксилозу).

В рамках настоящего изобретения термин «предварительная обработка» должен пониматься как обозначение способа, приводящего к, по меньшей мере, частичным удалению и выделению гемицеллюлозы из целлюлозы и разрушению и удалению

лигниновой оболочки в целях уменьшения степени кристалличности целлюлозы и, таким образом, увеличения доступной площади поверхности целлюлозы и/или увеличения размера пор целлюлозы. Предварительная обработка преимущественно придает подвижность пентозной фракции лигноцеллюлозосодержащего материала, в то время как она одновременно улучшает пригодность к варке твердой целлюлозосодержащей фракции.

Способы, подходящие для использования при предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала, соответствующей стадии (а) настоящего изобретения, включают любые типы способов механической, биологической, химической и/или физической предварительной обработки, известных специалистам в соответствующей области техники. В рамках одного предпочтительного варианта осуществления способ предварительной обработки выбирают из способов механического измельчения, обработки кислотами и/или щелочами, влажного окисления, рН-регулируемого гидротермолиза и/или парового взрыва.

Термин «паровой взрыв», соответствующий настоящему изобретению, предпочтительно включает гидротермическую обработку под давлением при температуре в диапазоне от 60 до 350°C, предпочтительно от 80 до 300°C, в особенности предпочтительно от 100 до 250°C, а наиболее предпочтительно от 110 до 220°C, лигноцеллюлозосодержащего материала в отсутствие или в присутствии кислотного (такого как H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4) или основного/щелочного (то есть NH_4OH , $NaOH$, KOH , гидроксид кальция) катализаторов, которые добавляют при концентрациях в диапазоне от 0,01 до 15% (масс./масс.), предпочтительно от 0,05 до 12,5 % (масс./масс.), более предпочтительно от 0,1 до 10% (масс./масс.), а наиболее предпочтительно от 0,25 до 7,5%. В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения давление предпочтительно выбирают в диапазоне от 1 до 100 бар, предпочтительно от 2 до 50 бар, также предпочтительно от 3 до 25 бар, а наиболее предпочтительно от 5 до 15 бар. Времена реакции во время парового взрыва должны быть выбраны в диапазоне от 10 сек до 2 час, предпочтительно от 1 минуты до 1,5 часов, а наиболее предпочтительно от 5 минут до 1 часа, для получения эффективного преобразования компонентов биомассы при подготовке для ферментативного гидролиза. В рамках одного в особенности предпочтительного варианта осуществления предварительную обработку в виде «механического измельчения» лигноцеллюлозосодержащего материала проводят до или во время паровзрывной предварительной обработки, где механическое измельчение выбирают из группы, состоящей из механической переработки, дефибрирования, рубки, дробления, резки, облучения, размалывания и их комбинаций.

«Кислотная предварительная обработка», соответствующая настоящему изобретению, предпочтительно составляет непрерывную обработку разбавленной кислотой и/или мягкую кислотную обработку, такие как обработка при использовании серной кислоты или еще органических кислот, таких как уксусная кислота, лимонная кислота, винная кислота, янтарная кислота, хлористый водород или их смеси. Также могут быть использованы и другие кислоты. Термин «мягкая кислотная обработка», соответствующий настоящему изобретению должен пониматься как обозначение обработки, проводимой при значении рН в диапазоне от 1 до 5, предпочтительно при значении рН в диапазоне от 2 до 3, (по отношению к лигноцеллюлозосодержащему материалу). В одном предпочтительном варианте осуществления кислоту добавляют при концентрациях в диапазоне от 0,01 до 15% (масс.) (масс./масс.), предпочтительно от 0,05 до 12,5% (масс.) (масс./масс.), более предпочтительно от 0,1 до 10 % (масс.) (масс./масс.), а наиболее предпочтительно от 0,25 до 7,5% (масс.). Кислотой предпочтительно является серная кислота. Кислота может быть введена в контакт с лигноцеллюлозосодержащим материалом при температуре в диапазоне от 120 до 280°C, предпочтительно от 135 до 225°C, а наиболее предпочтительно от 150 до 200°C, в течение периода времени в диапазоне от 1 до 60 минут, предпочтительно от 2 до 30 минут, а наиболее предпочтительно от 5 до 15 минут. Добавление сильных кислот, таких как серная кислота, в рамках в особенности предпочтительных вариантов осуществления может быть использовано для удаления гемицеллюлозы.

Термин «химическая предварительная обработка», соответствующий настоящему изобретению, также относится к обработке лигноцеллюлозосодержащего материала при использовании H_2O_2 , озона, кислот Льюиса, $FeCl_3$, $(Al)_2SO_4$ в водных спиртах, глицерине, диоксане, феноле, этиленгликоле, $NaOH$, Na_2CO_3 и/или аммиака. Предпочтительные концентрации, температуру и продолжительность времени выбирают аналогично условиям, упомянутым выше в отношении кислотной предварительной обработки.

«Влажная окислительная предварительная обработка», соответствующая настоящему изобретению, включает использование окислителей, таких как окислители на сульфитной основе.

Термин «механическое измельчение» относится к любой механической обработке, которая промотирует выделение и/или высвобождение целлюлозы, гемицеллюлозы и/или лигнина из лигноцеллюлозосодержащего материала. Механические измельчение предпочтительно выбирают из группы, состоящей из механической переработки, дефибрирования, рубки, дробления, резки, облучения, размалывания, такого как сухое размалывание, влажное размалывание и вибрационное шаровое размалывание, и их

комбинаций.

Термин «биологическая предварительная обработка», соответствующий настоящему изобретению, относится к любой биологической предварительной обработке, которая промотирует выделение и/или высвобождение целлюлозы, гемицеллюлозы и/или лигнина из лигноцеллюлозосодержащего материала. Методики биологической предварительной обработки могут включать использование солубилизирующих лигнин микроорганизмов, таких как актиномицеты (например, штаммы *Streptomyces*), белокрасная плесень.

Способы предварительной обработки, подходящие для использования в способе настоящего изобретения, должны быть осуществлены в подходящих для использования устройствах, известных для специалистов в соответствующей области техники. Устройство, подходящее для использования при проведении химической предварительной обработки, может относиться к любому типу емкости, такой как реактор периодического действия. Устройство, подходящее для использования при осуществлении парового взрыва, может относиться к любому типу емкости, такой как реактор периодического действия, но паровой взрыв также может быть осуществлен и в шнековом реакторе, предпочтительно в шнековом реакторе непрерывного действия.

В одном предпочтительном варианте осуществления уровень содержания твердого вещества для подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала доходит вплоть до 75% (масс./масс.), предпочтительно находится в диапазоне от 25 до 65% (масс./масс.), а в особенности предпочтительно от 40 до 55% (масс./масс.).

В рамках способа настоящего изобретения после этого подвергнутый предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащий материал вводят в контакт с, по меньшей мере, одним ферментом, относящимся к классу гидролаз, для разложения подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала на ферментируемые сахара, такие как мономерные сахара в виде гексоз (то есть глюкозы) и пентоз (то есть ксилозы). Введение в контакт может быть проведено при использовании любого способа, известного для специалистов в соответствующей области техники своей пригодностью для использования в целях изобретения.

Гидролизат, полученный в результате ферментативного гидролиза подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала, предпочтительно характеризуется высоким уровнем содержания ферментируемого сахара, предпочтительно имеющим порядок величины в диапазоне от 5 до 20% (масс./об.). Уровень содержания сахара в данном контексте должен пониматься как уровень содержания всех пентоз и гексоз. В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения гидролизат

характеризуется уровнем содержания сахара в диапазоне от 8 до 12,5% (масс./об.). В одном более предпочтительном варианте осуществления изобретения гидролизат также содержит дополнительные питательные вещества (то есть белки, соли и высшие сахара, такие как олигосахариды).

Введение в контакт, соответствующее стадии (b) настоящего изобретения, предпочтительно проводят в условиях, в которых совокупная дозировка фермента составляет от 0,05 до 10% (масс./масс.) от исходного сырья, предпочтительно от 0,1 до 5% (масс./масс.) от исходного сырья, дополнительно предпочтительно от 0,15 до 4% (масс./масс.) от исходного сырья, а в особенности предпочтительно от 0,2 до 3,5% (масс./масс.) от исходного сырья. В зависимости от режима дозирования и проявляющей специфическую активность композиции использованной системы фермента биомассу гидролизуют при температуре в диапазоне от 40 до 60°C в течение от 1 до 7 дней, предпочтительно от 45 до 55°C в течение от 18 до 96 часов. Введение в контакт, соответствующее стадии (b) настоящего изобретения, предпочтительно проводят при значении pH в диапазоне от 3 до 8, предпочтительно при значении pH в диапазоне от 4 до 6, в особенности при значении pH в диапазоне от 4,5 до 5,5. В одном в особенности предпочтительном варианте осуществления данного изобретения периодический гидролиз или гидролиз с периодической загрузкой для подвергнутой предварительной обработке соломы зерновых злаков осуществляют при дозировках фермента в диапазоне 0,25-0,8% (масс./масс.) от исходного сырья при наличии или в отсутствие дополнительного восполнения бета-глюкозидазы и при температуре в диапазоне от 47 до 53°C в течение 72 часов. Как это ни удивительно, но даже при режимах с малой дозировкой фермента могли быть получены выходы гидролиза, большие, чем 70% (масс./масс.) по отношению к совокупным сахарам, содержащимся в упомянутом исходном сырье.

Введение в контакт, соответствующее стадии (b) настоящего изобретения, проводят в емкости гидролиза. Подходящие для использования емкости для специалистов в соответствующей области техники известны и предпочтительно выбираются из реакторов периодического действия и реакторов с периодической загрузкой.

В рамках настоящего изобретения термин «ферменты, относящиеся к классу гидролаз» должен пониматься как включающий любой фермент, способный обеспечивать проведение гидролиза химической связи. Ферменты, относящиеся к классу гидролаз, при классификации ферментов по шифру КФ относятся к категории ЕС 3. В одном предпочтительном варианте осуществления ферментативные активности, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз, соответствующих настоящему изобретению, включают одну или несколько активностей, выбираемых из активностей

экзо- и эндоцеллюлаз (то есть целлобиогидролазы (CBH) I, II, эндоглюканызы (EG) I-IV, бета-глюкозидазы (BGL)), экзо- и эндогемицеллюлаз (то есть ксиланазы, ксилозидазы, ксилобиазы, арабиназы, арабинофукозидазы, маннанызы, маннозидазы, галактазы и галактозидазы) и эстераз. В рамках одного предпочтительного варианта осуществления, по меньшей мере, один фермент, относящийся к классу гидролаз, соответствующих настоящему изобретению, демонстрирует одну или несколько активностей, выбираемых из группы, состоящей из: целлобиогидролазы типа I или типа II (CBH I или CBH II), эндоглюканызы типа I, II, III или IV (EGI, EGII, EGIII, EGIV), бета-глюкозидазы (BGL), эстеразы, экзогемицеллюлазы и эндогемицеллюлазы. Еще более предпочитается, чтобы экзогемицеллюлазу и эндогемицеллюлазу предпочтительно выбирали бы из ксиланазы, ксилозидазы, ксилобиазы, арабиназы, арабинофукозидазы, маннанызы, маннозидазы, галактазы и галактозидазы.

В соответствии со стадией (с) способа настоящего изобретения гидролизат после этого выделяют из емкости гидролиза, а впоследствии разделяют на две части (i) и (ii). Выделение предпочтительно проводят при высвобождении, по меньшей мере, 70% совокупных сахаров, присутствующих в первоначальном исходном сырье, предпочтительно, по меньшей мере, 75%, а наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 80%. В рамках одного предпочтительного варианта осуществления соотношение между частью (i) гидролизата и частью (ii) выбирают в диапазоне от 0,01 до 1, предпочтительно от 0,02 до 0,5, также предпочтительно от 0,04 до 0,25, а наиболее предпочтительно от 0,05 до 0,1.

Выделение, соответствующее стадии (с) способа настоящего изобретения, может быть проведено при использовании любого способа, известного для специалистов в соответствующей области техники своей пригодностью для использования в целях изобретения. В рамках одного предпочтительного варианта осуществления выделение проводят в результате разделения твердой и жидкой фаз, такого как фильтрование, отжимание, мембранное разделение, флотирование, осаждение, декантирование и центрифугирование или их комбинации. Предпочтительными являются разделения твердой и жидкой фаз при использовании фильтра. Дополнительно в особенности предпочтительным является использование фильтр-пресса. Остатки после фильтрования должны характеризоваться минимальным уровнем содержания твердого вещества в 20% (масс./масс.), предпочтительно 30% (масс./масс.), в особенности предпочтительно 40% (масс./масс.), а наиболее предпочтительно 50% (масс./масс.), твердого содержимого. Еще один способ выделения, соответствующий стадии (с), представляет собой центрифугирование в результате, например, использования декантатора.

В соответствии со стадией (с) способа настоящего изобретения после этого часть (i) гидролизата направляют в емкость культивирования. Подходящие для использования емкости известны для специалистов в соответствующей области техники и предпочтительно выбираются из реакторов периодического действия и реакторов с периодической загрузкой. Емкость культивирования предпочтительно оснащают перемешивающим устройством и устройством аэрирования. В рамках еще одного предпочтительного варианта осуществления настоящего изобретения часть подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала может быть добавлена непосредственно в емкость культивирования. Предпочтительные количества добавленного подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала находятся в диапазоне от 1 до 35% ((масс./масс.) по отношению к совокупной массе материала культивирования), предпочтительно от 5 до 30% ((масс./масс.) по отношению к совокупной массе материала культивирования), а наиболее предпочтительно от 10 до 20% ((масс./масс.) по отношению к совокупной массе материала культивирования).

В соответствии со стадией (d) способа настоящего изобретения часть (i) гидролизата после этого подвергают ферментированию при использовании, по меньшей мере, одного микроорганизма, способного обеспечивать получение, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз.

«По меньшей мере, один микроорганизм, способный обеспечивать получение, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз» предпочтительно выбирают из следующих далее видов *Actinobacter sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Burkholdria sp.*, *Clostridia sp.*, *Caldicellulosiruptor sp.*, *Cellvibrio sp.*, *Halobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Xanthomonas sp.* и *Thermobifida sp.*, *Pyrochoccus sp.*, *Sulphobolus sp.*, *Staphylothermus sp.* и *Thermococcus sp.*.

«По меньшей мере, одна плесень, способная обеспечивать получение, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз» предпочтительно выбирают из следующих далее видов *Trichoderma sp.*, *Hypocrea sp.*, *Aspergillus sp.*, *Chaetomium sp.*, *Chrysosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Humicola sp.*, *Orpinomyces sp.*, *Pencillium sp.*, *Phanerochaete sp.*, *Piromyces sp.*, *Talaromyces sp.*, *Trametes sp.* и *Trichoderma sp.* или их соответствующих голоморфов. В особенности предпочтительной является плесень, выбираемая из видов *Trichoderma sp.* и *Talaromyces sp.*, в то время как также возможными являются и комбинации из одной или нескольких плесеней, но также и комбинации из одного или нескольких представителей, выбираемых из плесеней и/или микроорганизмов.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения

получения фермента добиваются при использовании сверхпродуцирующего целлюлазу штамма мицелиальной плесени вида *Trichoderma reesei* (анаморф: *Hypocrea jecornia*).

Ферментирование, соответствующее стадии (d) способа настоящего изобретения, проводят в течение периода времени в диапазоне от 1 часа до 14 дней, предпочтительно от 10 часов до 7 дней, дополнительно предпочтительно от 24 часов до 5 дней, предпочтительно при постоянном перемешивании с подводом мощности в диапазоне от 150 до 1900 Вт/м³, а более предпочтительно от 500 до 1500 Вт/м³, и предпочтительно при значении рН в диапазоне от 2,5 до 8, предпочтительно от 3,0 до 7, в особенности предпочтительно от 3,5 до 6,0, и предпочтительно при температуре в диапазоне от 15 до 70°C, предпочтительно от 20 до 55°C, а в особенности предпочтительно от 25 до 35°C, в условиях, регулируемых по уровню содержания кислорода. Средний уровень растворенного кислорода преимущественно выбирают в диапазоне от 0,01% до 80%, предпочтительно от 0,1% до 50%, в особенности предпочтительно от 1% до 30%, а наиболее предпочтительно от 3% до 15%. В рамках одного в особенности предпочтительного варианта осуществления уровень растворенного кислорода регулируют при использовании перемешивающего устройства или потока сжатого воздуха или внутреннего давления реактора или комбинации из двух или трех вариантов данных мер.

В рамках одного предпочтительного варианта осуществления концентрация растворимых сахаров во время ферментирования, соответствующего стадии (d) способа изобретения, является меньшей, чем 10% (масс./об.), дополнительно предпочтительно меньшей, чем 8% (масс./об.), а в особенности предпочтительно меньшей, чем 5% (масс./об.). Часть (i) гидролизата предпочтительно направляют в емкость культивирования в результате загрузки. Термин «загрузка», соответствующий настоящему изобретению, обозначает последовательное добавление части (i) гидролизата в емкость культивирования. «Скорость загрузки» в соответствии с использованием в рамках настоящего изобретения определяют как объем гидролизата, переводимый в емкость культивирования и измеряемый в м³/час. Специалисты в соответствующей области техники способны выбрать скорость загрузки, подходящую для использования в конкретном способе. Загрузку гидролизата предпочтительно проводят при постоянной скорости загрузки или переменной скорости загрузки или при использовании комбинации обоих вариантов во время стадии (d) способа изобретения. Загрузку гидролизата предпочтительно проводят непрерывно во время стадии (d) способа изобретения или с временными интервалами. Предпочтительные интервалы представляют собой – например, по отношению к совокупному времени ферментирования в 100 часов – например,

постоянную загрузку в течение 60 часов, что после этого прекращают вплоть до окончания времени ферментирования в 100 часов. Еще один возможный пример заключается в начальном проведении операции при постоянной загрузке в течение 20 часов, что прерывают по истечении 20 часов и возобновляют, как только ферментируемый сахар в гидролизате будет полностью подвергнут ферментированию.

После ферментирования подвергнутый ферментированию гидролизат повторно направляют в емкость гидролиза, соответствующую стадии (е) способа настоящего изобретения. Повторное направление, соответствующее стадии (е) способа настоящего изобретения, может быть проведено при использовании любого способа, известного для специалистов в соответствующей области техники своей пригодностью для использования в целях изобретения. Во время повторного направления, соответствующего стадии (е) способа изобретения, гидролизат предпочтительно подвергают физической, механической и/или химической переработке. Предпочтительные способы повторного направления включают перекачивание или другие способы требующего затрат мощности транспортирования суспензий, такие как поточное высокосдвиговое принудительное перемешивание. В рамках одного в особенности предпочтительного варианта осуществления повторное направление осуществляют в результате перекачивания гидролизата в емкость гидролиза. Переработка гидролизата до ферментирования, соответствующего стадии (d) способа изобретения, в результате будет приводить к получению еще более ускоренной кинетики гидролиза и превосходного выхода мономерного сахара, поскольку связанные с клеткой ферменты легче высвобождаются из плесени и/или микроорганизма.

В зависимости от использованного способа предварительной обработки во время стадии (а) способа настоящего изобретения образуются вещества, ингибирующие, по меньшей мере, один фермент и/или, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени. Данные соединения серьезно уменьшают скорость как гидролиза, так и ферментирования.

Способ изобретения, соответствующий стадиям от (а) до (с) согласно приведенному выше определению изобретения, само собой разумеется, действительно уже обеспечивает получение различных преимуществ в отношении стоимости и эффективности вследствие интегрированного самодостаточного получения фермента, однако, осуществление способа непрерывным образом в течение нескольких дней может приводить к накоплению данных ингибирующих веществ, что будет компенсировать некоторые из данных преимуществ, приводя к замедлению получения фермента и/или гидролиза. Для гарантированного осуществления способа самодостаточного ферментного

гидролиза, который также является привлекательным для реализации в способах получения в промышленных масштабах, таких как последовательное получение продуктов ферментирования (например, биоэтанола), изобретатели настоящего изобретения к своему удивлению обнаружили, что данные риски могут быть предотвращены в результате удаления одного или нескольких данных веществ, интегрированного на определенных ступенях способа.

Данные ингибирующие вещества представляют собой продукты деструкции лигноцеллюлозы, в том числе продукты деструкции лигнина, продукты деструкции целлюлозы и продукты деструкции гемицеллюлозы. Продукты деструкции лигнина могут быть фенольными по своей природе. Продукты деструкции гемицеллюлозы включают фураны из сахаров (таких как гексозы и/или пентозы), в том числе ксилозы, маннозы, галактозы, рамнозы и арабинозы. Примеры гемицеллюлоз включают ксилан, галактоглюкоманнан, арабиногалактан, арабиноглюкуроноксиан, глюкуроноксиан и их производные и комбинации. Примеры продуктов деструкции лигноцеллюлозы включают 4-ОН-бензиловый спирт, 4-ОН-бензальдегид, 4-ОН-бензойную кислоту, триметилбензальдегид, 2-фуранкарбоновую кислоту, кумаровую кислоту, феруловую кислоту, фенол, гваякол, вератрол, пирогаллол, монометилловый простой эфир пирогаллола, ванилиновый спирт, ванилин, изованилин, ванилиновую кислоту, изованилиновую кислоту, гомованилиновую кислоту, вератриловый спирт, вератральдегид, вератровую кислоту, 2-О-метилгалловую кислоту, сирингиловый спирт, сирингальдегид, сиреневую кислоту, триметилгалловую кислоту, гомокатехин, этилванилин, креозол, п-метиланизол, анисовый альдегид, анисовую кислоту, фурфураль, гидроксиметилфурфураль, 5-гидроксиметилфурфураль, муравьиную кислоту, уксусную кислоту, левулиновую кислоту, коричную кислоту, кониферилловый альдегид, изоевгенол, гидрохинон, евгенол или их комбинации.

Для гарантированного получения наиболее эффективного способа в рамках одного предпочтительного варианта осуществления способа настоящего изобретения удаляемым, по меньшей мере, одним веществом, ингибирующим, по меньшей мере, один фермент и/или ингибирующим, по меньшей мере, один микроорганизм, является вещество, ингибирующее, по меньшей мере, один фермент, относящийся к классу гидролаз, и/или ингибирующее, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени и способного обеспечивать получение, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз.

В рамках одного дополнительно в особенности предпочтительного варианта осуществления вещество является ингибирующим, по меньшей мере, одну плесень,

выбираемую из группы, состоящей из видов *Trichoderma sp.* и *Talaromyces sp.*, таких как *Trichoderma reesei*, и/или ингибирующим, по меньшей мере, один микроорганизм, выбираемый из группы, состоящей из видов *Saccharomyces sp.*, *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.* и *Pichia sp.*.

В рамках одного предпочтительного варианта осуществления способа настоящего изобретения данное, по меньшей мере, одно вещество удаляют из подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала, соответствующего стадии (а), и/или из части (i) и/или (ii) гидролизата, соответствующего стадии (с).

В рамках дополнительно предпочтительных вариантов осуществление удаление проводят в результате добавления, по меньшей мере, одного адсорбента к подвергнутому предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащему материалу и/или части (i) и/или (ii) гидролизата, соответствующего стадии (с). Адсорбент предпочтительно выбирают из группы, состоящей из активированного угля, диоксида кремния, силикатных минералов, цеолитов, древесного угля, глины, ионообменных смол и их смесей, в то время как в особенности предпочтительными являются активированный уголь и/или древесный уголь.

Дополнительно предпочитается, чтобы к подвергнутому предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащему материалу, по меньшей мере, один адсорбент добавляли бы в результате добавления адсорбента до перевода подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала в емкость гидролиза. Однако, в объем настоящего изобретения также попадают и добавление адсорбента непосредственно в емкость гидролиза или добавление адсорбента непосредственно до выделения, соответствующего стадии (с).

Удаление, по меньшей мере, одного ингибирующего соединения в результате добавления адсорбента обеспечивает получение значительных преимуществ. С другой стороны, значительно улучшается фильтруемость. Кроме того, в случае использования в качестве адсорбента активированного угля или древесного угля улучшится сжигаемость осадка на фильтре, и при высушивании не потребуется затрачивать энергии, или необходимой будет затрата только минимального количества энергии. Таким образом, в результате сжигания осадка на фильтре может быть достигнуто получение энергонезависимого способа.

В рамках еще одного предпочтительного варианта настоящего изобретения удаление, по меньшей мере, одного ингибирующего вещества из части (i) и/или (ii) гидролизата проводят в результате выпаривания. Вследствие летучего характера большинства ингибирующих веществ выпаривание представляет собой еще один эффективный способ удаления. «Выпаривание», соответствующее настоящему

изобретению, преимущественно проводят при пониженном давлении, преимущественно при давлении, меньшем, чем атмосферное давление, предпочтительно при менее, чем 750 мбар абсолютного давления, более предпочтительно при менее, чем 500 мбар абсолютного давления, еще более предпочтительно при менее, чем 250 мбар абсолютного давления, а наиболее предпочтительно при менее, чем 125 мбар абсолютного давления. Предпочтительные диапазоны заключены в пределах от 75 до 750 мбар абсолютного давления и от 75 до 250 мбар абсолютного давления. Во время выпаривания температуру предпочтительно выдерживают на уровне менее, чем 120°C, более предпочтительно менее, чем 100°C, еще более предпочтительно менее, чем 90°C, а наиболее предпочтительно менее, чем 80°C. Предпочтительные диапазоны заключены в пределах от 45 до 120°C и от 45 до 100°C. Время пребывания преимущественно выбирают в диапазоне от 0,1 сек до 10 час, предпочтительно от 1 сек до 1 час, более предпочтительно от 10 сек до 30 мин, наиболее предпочтительно от 30 сек до 10 мин. Значение pH предпочтительно выдерживают на уровне менее, чем pH 6, более предпочтительно менее, чем pH 5,5, еще более предпочтительно менее, чем 5,0, а наиболее предпочтительно менее, чем 4,8. Предпочтительные диапазоны заключены в пределах от 3,5 до 6 и от 4,0 до 5,0. Предпочтительными испарителями являются циркуляционные испарители, тонкопленочные испарители, испарители с распределяемой пленкой и испарители с падающей пленкой.

Удаление, по меньшей мере, одного ингибирующего вещества в результате выпаривания обеспечивает получение дополнительных преимуществ, поскольку выпаривание также позволяет добиться выгоды, заключающейся в стерилизации гидролизата. Таким образом, может быть предотвращено перекрестное загрязнение во время ферментирования. Кроме того, наряду с большинством ингибирующих веществ будет выпариваться и существенное количество воды, что приведет к получению концентрированного гидролизата (то есть уменьшенному объему и большей концентрации сахара), приводя в результате к получению дополнительного уменьшения стоимости вследствие увеличенной пропускной способности и минимизированного объема реактора. Выпаривание представляет собой такой эффективный способ удаления, когда существенные преимущества способа изобретения могут быть уже достигнуты в результате использования данного способа только для части (i) гидролизата.

В рамках еще одного предпочтительного варианта осуществления возможным также является и объединение нескольких способов удаления, где в особенности предпочтительным является объединение добавления адсорбента до перевода гидролизата в емкость гидролиза с выпариванием, используемым для части (i) и/или (ii) гидролизата. В

рамках данного конкретного варианта осуществления предпочтительным также является добавление адсорбента до выделения, соответствующего стадии с), в особенности предпочтительно до гидролиза, соответствующего стадии b). В особенности предпочтительным является невключение в способ, соответствующий изобретению, удаления в результате промывания подвергнутого предварительной обработке материала и/или гидролизата.

В рамках еще одного предпочтительного варианта осуществления способа настоящего изобретения в емкость культивирования добавляют дополнительное количество в диапазоне от 0,01 до 30% (масс./об.) лигноцеллюлозосодержащего материала, предпочтительно от 0,1 до 25% (масс./об.), дополнительно предпочтительно от 0,5 до 22% (масс./об.), а в особенности предпочтительно от 1 до 20% (масс./об.). В рамках одного в особенности предпочтительного варианта осуществления лигноцеллюлозосодержащий материал получают в результате его выделения из емкости предварительной обработки. Добавление подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала будет приводить к медленному высвобождению углерода и реализации функции индуктора экспрессии целлюлазы.

В еще одном аспекте настоящее изобретение, кроме того, направлено на способ получения органического соединения из части (ii) гидролизата согласно приведенному выше определению изобретения, включающий стадию

(f1) введения части (ii) гидролизата в контакт с, по меньшей мере, одним представителем, выбираемым из микроорганизма и/или плесени и способным обеспечивать получение органического соединения, выбираемого из группы, состоящей из органических кислот, аминокислот, капролактамов, антибиотиков, витаминов, ферментов, нуклеотидов/нуклеозидов, биогаза, белков, полисахаридов, аминоклюканов, органических растворителей, биотоплив, биологических поверхностно-активных веществ, аминоклюканов, производных сахаров и их смесей;

или

(f2) осуществления для части (ii) гидролизата способа химического превращения, каталитического превращения, хроматографического разделения, мембранного разделения и/или кристаллизации.

В соответствии со способом получения органического соединения, соответствующим стадии (f1) согласно приведенному выше определению изобретения, температуру во время введения части (ii) гидролизата в контакт с, по меньшей мере, одним микроорганизмом выбирают в диапазоне от 10 до 65°C, предпочтительно от 15 до 55°C, в особенности предпочтительно от 20 до 50°C, наиболее предпочтительно от 25 до

45°C.

В особенности предпочтительным является выбор, по меньшей мере, одного микроорганизма из мезофильных дрожжей, таких как все виды рода *Saccharomyces*, в особенности виды *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces bulderi*, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces cariocus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces dairenensis*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces martiniae*, *Saccharomyces monacensis*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces spencerorum*, *Saccharomyces turicensis*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces zonatus*, а также *Arxula adeninovorans*, *Ashbya gossypii*, *Hansenula polymorpha*, *Debaryomyces hansenii*, *Hortea werneckii*, *Kluyveromyces lactis*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Trichosporon domesticum*, *Trichosporon montevidense*, *Xanthophyllomyces dendrohous*, *Yarrowia lypolytica*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia stipitis*, *Pichia segobiensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, *Candida boidinii*, *Candida tenuis*, *Pachysolen tannophilus*, *Hansenula polymorpha*, *Candida famata*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Candida sonorensis*, *Candida maltosa*, *Issatchenkia terricola*, *Kloeckera apis*, *Pichia barkeri*, *Pichia cactophila*, *Pichia deserticola*, *Pichia norvegensis*, *Pichia membranefaciens*, *Pichia mexicana* и *Torulasporea delbrueckii* и любая их комбинация.

В одном альтернативном предпочтительном варианте осуществления способа получения органического соединения из части (ii) гидролизата, по меньшей мере, один микроорганизм выбирают из термофильных микроорганизмов, которые предпочтительно выбирают из видов *Candida bovina*, *Candida picachoensis*, *Candida emberorum*, *Candida pintolopesii*, *Candida thermophila*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kazachstania telluris*, *Issatchenkia orientalis*, *Lachancea thermotolerans* и любой их комбинации. Предпочтительные термофильные бактерии включают виды *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydrosulphuricum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobium brockii*, *Thermobacteroides acetoethylicus*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium thermoautotrophicum*, *Acetogenium kivui*, *Desulfotomaculum nigrificans*, *Desulfovibrio thermophilus*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Thermoanaerobacter mathranii* и любую их комбинацию.

Использование следующих далее мезофильных дрожжей является в особенности предпочтительным: виды *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilu*

и/или *Candida shehatae*.

В одном альтернативном варианте осуществления способа получения органических соединений из части (ii) гидролизата используют, по меньшей мере, одну плесень. По меньшей мере, одну плесень выбирают из видов *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Hypocrea sp.*, *Penicillium sp.*, *Acremonium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Talaromyces sp.* и любой их комбинации.

В одном альтернативном варианте осуществления способа получения органических соединений из части (ii) гидролизата микроорганизм выбирают из видов бактерий, таких как виды *Clostridium acetobutylicum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sp.*, *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* и любая их комбинация.

Кроме того, попадающей в объем настоящего изобретения должна пониматься и любая комбинация из вышеперечисленных микроорганизмов и/или плесеней.

Ферментирование предпочтительно проводят в периодическом режиме (дискретно), в режиме с периодической загрузкой или в непрерывном режиме. Наиболее предпочтительно ферментирование проводят в периодическом режиме.

В рамках одного дополнительного предпочтительного варианта осуществления к части (ii) гидролизата до стадии f1) способа получения органического соединения добавляют минеральные вещества, такие как медь, цинк, магний, кальций, железо, и азотсодержащие соединения, такие как нитрат, аминокислоты, аммиак.

Ценные органические соединения, получающиеся в результате бактериального ферментирования части (ii) гидролизата, включают нижеследующее, но не ограничиваются только этим: органические кислоты (такие как уксусная кислота, молочная кислота, янтарная кислота, итаконовая кислота, фумаровая кислота, пропионовая кислота и глюкуроновая кислота), аминокислоты (такие как глютаминовая кислота, лейцин, лизин, треонин, аспарагиновая кислота, фенилаланин, цистеин), капролактамы (такие как альфа-амино-капролактамы), антибиотики (такие как блеомицин, виргиниамицин, линкомицин, моненсин, бластицидин, тетрациклин), витамины (такие как витамин B₂, B₁₂ и C), ферменты, нуклеотиды/нуклеозиды (такие как НАДН, АТФ, цАМФ, ФАД, кофермент А), биогаз, биополимеры (такие как полигидроксibuтират, полиамиды/фиброины), белки, полисахариды (такие как ксантан, декстран), аминоглюканы (такие как гиалуроновая кислота), а также органические растворители и биотоплива (такие как ацетон, этанол, бутанол, пропандиол).

Ценные органические соединения, получающиеся в результате дрожжевого ферментирования части (ii) гидролизата, включают нижеследующее, но не

ограничиваются только этим: органические растворители (например, этанол, пропанол), нуклеотиды (например, РНК), биологические поверхностно-активные вещества (например, софорозолипиды), ферменты и биополимеры (например, спидроины).

Ценные органические соединения, получающиеся в результате плесневого ферментирования части (ii) гидролизата, включают органические кислоты (такие как лимонная кислота, фумаровая кислота, итаконовая кислота), антибиотики (такие как пенициллин, цефалоспорин), ферменты и полисахариды (такие как хитин).

В одном дополнительном предпочтительном варианте осуществления данного способа органическое соединение выбирают из спиртов, органических кислот, биополимеров, антибиотиков, аминокислот, капролактамов, полисахаридов, органических растворителей, биотоплив, аминоклюканов, нуклеотидов/нуклеозидов, витаминов, биологических поверхностно-активных веществ, ферментов и их смесей.

В соответствии со способом получения органического соединения, соответствующим стадии (f2), осуществление для части (ii) гидролизата способа химического превращения, каталитического превращения, хроматографического разделения, мембранного разделения и/или кристаллизации реализуют при использовании хроматографических способов и/или стадий фильтрования для использования очищенных сахаров при ферментировании (например, полимеры на основе молочной кислоты) и/или химическом превращении (получение кислоты ФДКК).

В еще одном аспекте настоящее изобретение также относится к органическому соединению, полученному в соответствии со способом согласно приведенному выше определению изобретения.

В следующем далее изложении описываются в особенности предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, которые не должны пониматься как ограничивающие изобретение в каком-либо отношении.

В особенности предпочтительный вариант осуществления 1

Способ самодостаточного ферментативного гидролиза лигноцеллюлозосодержащего материала, включающий стадии:

(a) проведения для лигноцеллюлозосодержащего материала предварительной обработки в устройстве предварительной обработки;

(b) введения подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала стадии а) в контакт с, по меньшей мере, одним ферментом, относящимся к классу гидролаз, в емкости гидролиза для получения гидролизата;

(c) выделения гидролизата и последующего разделения гидролизата на две части (i)

и (ii), где часть (i) направляют в емкость культивирования;

(d) ферментирования части (i) гидролизата при использовании, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени и способного обеспечивать получение, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз;

и

(e) повторного направления подвергнутого ферментированию гидролизата стадии d) в емкость гидролиза стадии b);

где подвергнутый предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащий материал подвергают обработке для удаления, по меньшей мере, одного вещества, ингибирующего, по меньшей мере, один фермент и/или, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени, в результате добавления, по меньшей мере, одного адсорбента, предпочтительно выбираемого из активированного угля, древесного угля и их смесей.

В особенности предпочтительный вариант осуществления 2

Способ самодостаточного ферментативного гидролиза лигноцеллюлозосодержащего материала, включающий стадии:

(a) проведения для лигноцеллюлозосодержащего материала предварительной обработки в устройстве предварительной обработки;

(b) введения подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала стадии a) в контакт с, по меньшей мере, одним ферментом, относящимся к классу гидролаз, в емкости гидролиза для получения гидролизата;

(c) выделения гидролизата и последующего разделения гидролизата на две части (i) и (ii), где часть (i) направляют в емкость культивирования;

(d) ферментирования части (i) гидролизата при использовании, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени и способного обеспечивать получение, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз;

и

(e) повторного направления подвергнутого ферментированию гидролизата стадии d) в емкость гидролиза стадии b);

где часть (i) и/или часть (ii) гидролизата подвергают обработке для удаления, по меньшей мере, одного вещества, ингибирующего, по меньшей мере, один фермент и/или, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени,

в результате выпаривания.

В особенности предпочтительный вариант осуществления 3

Способ самодостаточного ферментативного гидролиза лигноцеллюлозосодержащего материала, включающий стадии:

(a) проведения для лигноцеллюлозосодержащего материала предварительной обработки в устройстве предварительной обработки;

(b) введения подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала стадии a) в контакт с, по меньшей мере, одним ферментом, относящимся к классу гидролаз, в емкости гидролиза для получения гидролизата;

(c) выделения гидролизата и последующего разделения гидролизата на две части (i) и (ii), где часть (i) направляют в емкость культивирования;

(d) ферментирования части (i) гидролизата при использовании, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени и способного обеспечивать получение, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз;

и

(e) повторного направления подвергнутого ферментированию гидролизата стадии d) в емкость гидролиза стадии b);

где подвергнутый предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащий материал подвергают обработке для удаления, по меньшей мере, одного вещества, ингибирующего, по меньшей мере, один фермент и/или, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени, в результате добавления, по меньшей мере, одного адсорбента, предпочтительно выбираемого из активированного угля, древесного угля и их смесей, и часть (i) и/или часть (ii) гидролизата подвергают обработке для удаления, по меньшей мере, одного вещества, ингибирующего, по меньшей мере, один фермент и/или, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени, в результате выпаривания.

В особенности предпочтительный вариант осуществления 4

Способ, соответствующий в особенности предпочтительному варианту осуществления 1, 2 или 3, где соотношение между частью (i) гидролизата и частью (ii) находится в диапазоне от 0,01 до 1, предпочтительно от 0,02 до 0,5, а наиболее предпочтительно от 0,05 до 0,1.

В особенности предпочтительный вариант осуществления 5

Способ, соответствующий в особенности предпочтительному варианту

осуществления 1, 2, 3 или 4, где в емкость культивирования добавляют дополнительное количество в диапазоне от 0,01 до 30% (масс./об.) лигноцеллюлозосодержащего материала, предпочтительно от 0,15 до 25% (масс./об.), дополнительно предпочтительно от 0,51 до 22% (масс./об.), а в особенности предпочтительно от 15 до 20% (масс./об.). В рамках данного варианта осуществления наиболее предпочтительным является наличие лигноцеллюлозосодержащего материала, являющегося подвергнутым предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащим материалом, предпочтительно полученным из устройства предварительной обработки.

В особенности предпочтительный вариант осуществления 6

Способ, соответствующий любому из в особенности предпочтительных вариантов осуществления от 1 до 5, где, по меньшей мере, один микроорганизм, способный обеспечивать получение, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз, выбирают из экзо- и эндоцеллюлаз, бета-глюкозидазы (BGL), экзо- и эндогемицеллюлаз и эстераз, и/или, по меньшей мере, одну плесень, способную обеспечивать получение, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз, выбирают из видов *Trichoderma* и *Talaromyces* и их смесей, а наиболее предпочтительно она представляет собой вид *Trichoderma reesei*.

В особенности предпочтительный вариант осуществления 7

Способ, соответствующий любому из в особенности предпочтительных вариантов осуществления от 1 до 6 и, кроме того, включающий стадию

(f1) введения части (ii) гидролизата в контакт с, по меньшей мере, одним представителем, выбираемым из микроорганизма и/или плесени и способным обеспечивать получение органического соединения, выбираемого из группы, состоящей из органических кислот, аминокислот, капролактамов, антибиотиков, витаминов, ферментов, нуклеотидов/нуклеозидов, биогаза, белков, полисахаридов, аминоклюканов, органических растворителей, биотоплив, биологических поверхностно-активных веществ, аминоклюканов, производных сахаров и их смесей.

Пример и фигура

Настоящее изобретение, кроме того, описывается при использовании следующих далее примера и фигуры. Пример и фигура представлены только в целях иллюстрации и не должны пониматься в качестве ограничения изобретения.

Фигура 1 демонстрирует технологическую схему способа, соответствующего настоящему изобретению. Пунктирная линия отображает опцию добавления части подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала непосредственно в емкость

культивирования.

Фигура 2 демонстрирует выход глюкозы, ксилозы и DL-лактата Na, а также количество уксусной кислоты и муравьиной кислоты при детоксифицировании гидролизата в результате выпаривания.

Пример 1

Пшеничная солома, удаление ингибирующего вещества в результате добавления древесного угля и выпаривания

Ферментирование проводят в системе перемешиваемого корпусного биореактора с устройством регулирования температуры, значения pH и уровня растворенного кислорода (= емкость культивирования). Культивирование начинают при 5% (масс./масс.) культуры для посева. Кроме того, среда содержит соли и минеральные вещества и концентрированный гидролизат в качестве основного источника углерода. Ферментирование проводят при pH 5, 30°C и уровне растворенного кислорода 25%. Загрузку части (i) гидролизата начинают по истечении 15 часов и непрерывно проводят в течение еще 85 часов. Совокупный объем загрузки составляет 50% при расчете на совокупный конечный объем ферментирования.

Подвергнутый ферментированию гидролизат, получающийся в результате ферментирования, перекачивают в подвергнутую предварительной обработке пшеничную солому для гидролиза последней.

Количество подвергнутой предварительной обработке пшеничной соломы, присутствующей на стадии гидролиза, выбирают таким образом, чтобы 1 м³ подвергнутого ферментированию гидролизата было бы добавлено к 2400 кг сухого вещества подвергнутой предварительной обработке пшеничной соломы.

Гидролиз проводят при 50°C, pH 5, в течение 96 час при перемешивании при 50 об./мин. После гидролиза к содержимому емкости гидролиза добавляют 1% (масс./об.) активированного древесного угля (гранулята). Содержимое инкубируют совместно с активированным древесным углем при комнатной температуре и при перемешивании при 250 об./мин. По истечении 1 часа проводят разделение твердой и жидкой фаз для извлечения детоксифицированного гидролизата в результате его выделения из остаточного твердого вещества при использовании центрифугирования или фильтрования (размер пор фильтра < 1 мм). После этого для 15% детоксифицированного гидролизата проводят стадию выпаривания в целях дополнительного удаления летучих ингибиторов и уменьшения объема данной части гидролизата до одной трети от начального объема. Затем в ферментирование вводят дважды детоксифицированный и концентрированный

гидролизат согласно приведенному выше описанию изобретения. Остаток гидролизата (не подвергнутого выпариванию) может быть использован для получения органического соединения.

Пример 2

Пшеничная солома, удаление ингибирующего вещества в результате 3-кратного выпаривания

Ферментирование проводят в системе перемешиваемого корпусного биореактора с устройством регулирования температуры, значения рН и уровня растворенного кислорода (= емкость культивирования). Культивирование начинали при 5% (масс./масс.) культуры для посева. Кроме того, среда содержала соли и минеральные вещества и концентрированный гидролизат в качестве основного источника углерода. Ферментирование проводили при рН 5, 30°C и уровне растворенного кислорода 25%. Загрузку части (i) гидролизата начинали по истечении 15 часов и непрерывно проводили в течение еще 85 часов. Совокупный объем загрузки составлял 45% при расчете на совокупный конечный объем ферментирования.

Подвергнутый ферментированию гидролизат, получающийся в результате ферментирования, перекачивали в подвергнутую предварительной обработке пшеничную солому для гидролиза последней.

Количество подвергнутой предварительной обработке пшеничной соломы, присутствующей на стадии гидролиза, выбирали таким образом, чтобы 1 м³ подвергнутого ферментированию гидролизата было бы добавлено к 2400 кг сухого вещества подвергнутой предварительной обработке пшеничной соломы.

Гидролиз проводили при 50°C, рН 5, в течение 96 час при перемешивании при 50 об./мин. Затем после гидролиза для гидролизата проводили стадию выпаривания в целях удаления летучих ингибиторов и уменьшения объема гидролизата с коэффициентом 6,4. После этого в ферментирование вводили данный детоксицированный и концентрированный гидролизат согласно приведенному выше описанию изобретения.

Для выпаривания значение рН доводили до 4 при использовании серной кислоты, а после этого выпаривание проводили при 75°C и 100 мбар. Выпаривание прекращали при достижении концентрации сахара 500 г/л. В таблице 1 и на фигуре 2 продемонстрированы соответствующие выходы глюкозы, ксилозы и NaDI и количества муравьиной и уксусной кислоты. Данное детоксицирование в результате приводило к уменьшению количества уксусной кислоты более, чем на 80% и муравьиной кислоты ориентировочно на 30%. Результаты продемонстрированы в таблице 1 и на фигуре 2.

Таблица 1. Выходы глюкозы, ксилозы и количества муравьиной и уксусной кислоты после выпаривания

	Выход
Коэффициент	6,42
pH	-
Выходы	
Глюкоза	103%
Ксилоза	106%
Муравьиная кислота	72%
Уксусная кислота	16%

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ самодостаточного ферментативного гидролиза лигноцеллюлозосодержащего материала, включающий стадии:

(а) проведения для лигноцеллюлозосодержащего материала предварительной обработки в устройстве предварительной обработки;

(b) введения подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала стадии а) в контакт с, по меньшей мере, одним ферментом, относящимся к классу гидролаз, в емкости гидролиза для получения гидролизата;

(с) выделения гидролизата и последующего разделения гидролизата на две части (i) и (ii), где часть (i) направляют в емкость культивирования;

(d) ферментирования части (i) гидролизата при использовании, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени и способного обеспечивать получение, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз;

и

(е) повторного направления подвергнутого ферментированию гидролизата стадии d) в емкость гидролиза стадии b);

где подвергнутый предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащий материал и/или гидролизат подвергают обработке для удаления, по меньшей мере, одного вещества, ингибирующего, по меньшей мере, один фермент и/или, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени.

2. Способ по п. 1, где, по меньшей мере, одним веществом, ингибирующим, по меньшей мере, один фермент и/или ингибирующим, по меньшей мере, один микроорганизм, является вещество, ингибирующее, по меньшей мере, один фермент, относящийся к классу гидролаз, и/или ингибирующее, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из микроорганизма и/или плесени и способного обеспечивать получение, по меньшей мере, одного фермента, относящегося к классу гидролаз.

3. Способ по пп. 1 или 2, где вещество является ингибирующим, по меньшей мере, одного представителя, выбираемого из плесени и/или микроорганизма и выбираемого из группы, состоящей из видов *Trichoderma sp.* (анаморф: *Hypocrea sp.*), *Saccharomyces sp.*, *Clostridium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Pichia sp.* и *Talaromyces sp.*

4. Способ по любому из пп. от 1 до 3, где вещество удаляют из подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала, соответствующего

стадии (а), и/или из части (i) и/или (ii) гидролизата, соответствующего стадии (с).

5. Способ по любому из пп. от 1 до 4, где вещество удаляют в результате добавления, по меньшей мере, одного адсорбента к подвергнутому предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащему материалу и/или части (i) и/или (ii) гидролизата, соответствующего стадии (с).

6. Способ по п. 5, где адсорбент выбирают из группы, состоящей из активированного угля, диоксида кремния, силикатных минералов, цеолитов, древесного угля, глины, ионообменных смол и их смесей.

7. Способ по любому из пп. от 1 до 4, где вещество удаляют из части (i) и/или (ii) гидролизата, соответствующего стадии (с), в результате выпаривания.

8. Способ по любому из предшествующих пп., где в емкость культивирования добавляют дополнительное количество в диапазоне от 0,1 до 30% (масс./об.) лигноцеллюлозосодержащего материала.

9. Способ по п. 8, где лигноцеллюлозосодержащий материал получают в результате его выделения из емкости предварительной обработки.

10. Способ по любому из предшествующих пп., где соотношение между частью (i) гидролизата и частью (ii) находится в диапазоне от 0,01 до 1.

11. Способ по любому из предшествующих пп., где концентрация растворимых сахаров во время ферментирования, соответствующего стадии d), является меньшей, чем 10% (масс./об.).

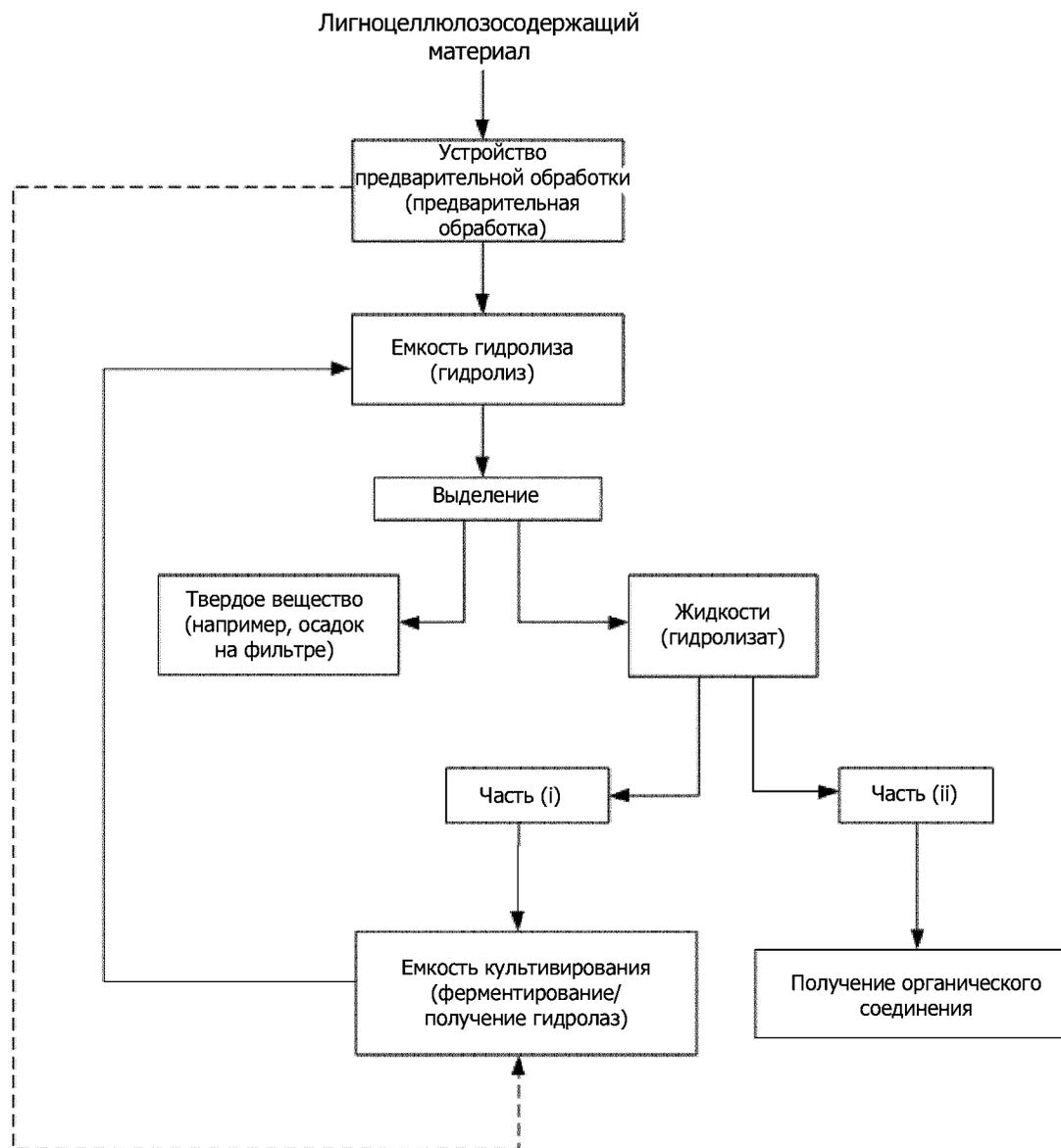
12. Способ получения органического соединения, включающий стадии по любому из пп. от 1 до 11 и дополнительно включающий стадию

(f1) введения части (ii) гидролизата в контакт с, по меньшей мере, одним представителем, выбираемым из микроорганизма и/или плесени и способным обеспечивать получение органического соединения, выбираемого из группы, состоящей из органических кислот, аминокислот, капролактамов, антибиотиков, витаминов, ферментов, нуклеотидов/нуклеозидов, биогаза, белков, полисахаридов, аминоклюканов, органических растворителей, биотоплив, биологических поверхностно-активных веществ, аминоклюканов, производных сахаров и их смесей;

или

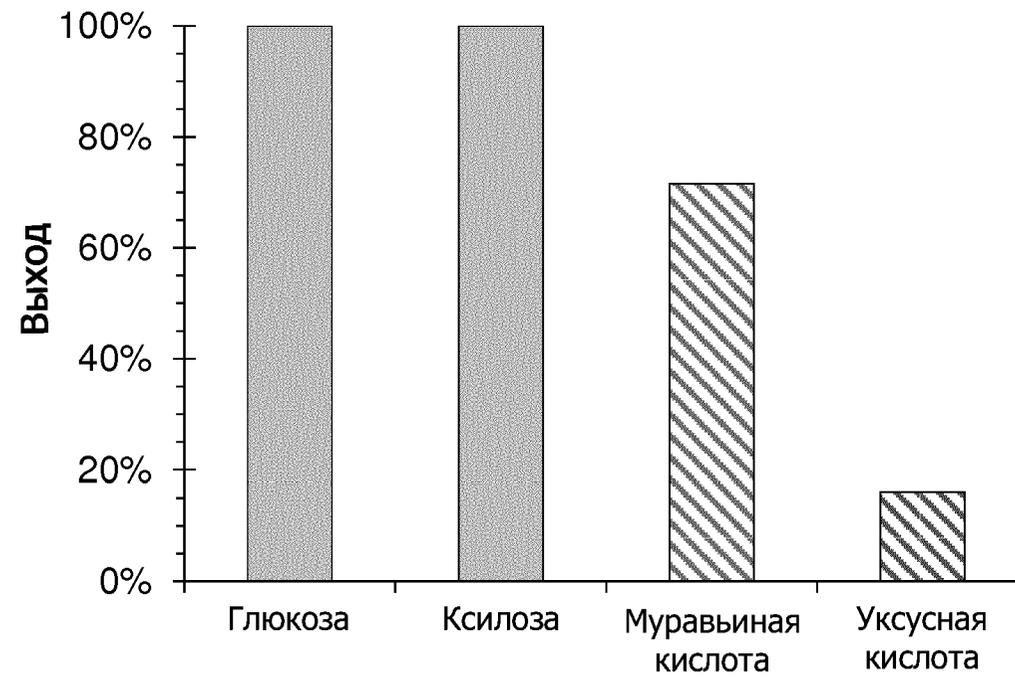
(f2) осуществления для части (ii) гидролизата способа химического превращения, каталитического превращения, хроматографического разделения, мембранного разделения и/или кристаллизации.

13. Органическое соединение, полученное в соответствии со способом по п. 12.



Фиг. 1

Выход после термического концентрирования
(коэффициент концентрирования 6,4)



Фиг. 2