

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **033749**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2019.11.21**

(51) Int. Cl. **C12P 19/14 (2006.01)**  
**C12P 7/06 (2006.01)**

(21) Номер заявки  
**201792601**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.05.12**

---

(54) **СПОСОБ ГИДРОЛИЗА БИОМАССЫ**

---

(31) **15169886.7**

(32) **2015.05.29**

(33) **EP**

(43) **2018.04.30**

(86) **PCT/EP2016/060747**

(87) **WO 2016/192955 2016.12.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**КЛАРИАНТ ИНТЕРНЭШНЛ ЛТД  
(CH)**

(72) Изобретатель:

**Цаврель Михаель, Цее Маркус,  
Бартух Йорг, Ферхюльсдонк Маркус  
(DE)**

(74) Представитель:

**Саломатина И.С., Фелицына С.Б.  
(RU)**

(56) **WO-A1-2014144565**  
**WO-A1-2014100685**  
**EP-A1-2548965**  
**WO-A1-2014075694**  
**EP-A1-2256208**

---

(57) Настоящее изобретение относится к новому и предпочтительному способу гидролиза биомассы, который обеспечивает полный гидролиз, в том числе и устойчивой биомассы, такой как солома сахарного тростника и жом сахарного тростника.

---

**B1**

**033749**

**033749**

**B1**

Настоящее изобретение относится к новому и предпочтительному способу гидролиза биомассы, который обеспечивает полный гидролиз, в том числе и труднорастворимой биомассы, такой как солома сахарного тростника и жом сахарного тростника.

Биомасса таких культур, как сахарная свекла, сахарный тростник, кукуруза, солома и другой сахарид- или полисахарид- и белоксодержащий материал, является ценным источником не только очищенных сахаридов, таких как мономерные или димерные сахара, но также и других компонентов, таких как аминокислоты, белки и минералы.

В известном уровне техники существуют способы для гидролиза и отделения и очистки отдельных компонентов, таких как сахара, из сахарной свеклы и сахарного тростника. Однако в таких способах другие ценные компоненты, такие как соединения клеточных стенок и белки, удаляются в отходы после экстракции и очистки мономерных и димерных сахаров, таких как сахароза. В общепринятом способе сахара выделяют, например, из сахарной свеклы или сахарного тростника, путем экстрагирования измельченной сахарной свеклы или тростника горячей водой в непрерывном противоточном процессе. Обычно такие способы требуют добавления дополнительных агентов, таких как CaO, в количестве примерно от 1 до 3 кг CaO на 100 кг биомассы. Продуктами этого способа являются раствор сахара, называемый диффузионным соком, и так называемая свекловичная пульпа или жом сахарного тростника. Далее диффузионный сок очищают и фильтруют, и затем концентрируют для получения сиропа (65-70% сухих веществ) или, после кристаллизации, для получения сахара-рафинада. Повышенные температуры и условия pH в ходе данного способа вызывают разрушение очень существенного количества моносахаридов, содержащихся в растворе. Кроме того, из-за разложения соединений азота образуется аммиак. В дополнение к этому, так называемая свекловичная пульпа или жом сахарного тростника по-прежнему содержит не только большую часть белков сахарной свеклы или тростника, но также и большую часть полисахаридов, таких как целлюлоза, гемицеллюлоза и пектин.

Предпочтительный способ, в котором используют ферменты для гидролиза свекловичной пульпы, описан в EP 256208 A1, однако полученный продукт по-прежнему содержит твердые компоненты сахарной свеклы.

Из-за их устойчивости к разложению промышленность сталкивается даже с еще большими препятствиями, когда в качестве исходного материала для получения моно- и димерных сахаров и других ценных компонентов используется солома сахарного тростника или жом сахарного тростника. Эта устойчивость вызвана низкой доступностью целлюлозы из-за внедрения целлюлозных волокон в лигнин и другие полимерные вещества. В способах известного уровня техники перевод в жидкое состояние редко превышает 60 мас.% исходного материала биомассы.

Таким образом, существует потребность в усовершенствованном способе гидролиза биомассы, в котором может быть получено не только большое количество мономерных и димерных сахаров, но также может быть минимизировано влияние ингибирования гидролиза и/или последующих процессов ферментации, вызванное образованием соединений, ингибирующих гидролизующие ферменты и/или микроорганизмы. Кроме того, существует потребность в энергоэффективном и экономичном способе.

Таким образом, задачей настоящего изобретения является разработка способа гидролиза биомассы, который не демонстрирует ни одного из недостатков способов, известных в существующем уровне техники.

Соответственно, в первом аспекте изобретение предлагает способ гидролиза биомассы, включающий стадии:

- a) контактирование биомассы с ферментной композицией, содержащей по меньшей мере один фермент, выбранный из класса гидролаз, в сосуде;
- b) разделение твердой и жидкой фаз;
- c) ферментативное превращение твердой фазы;
- d) объединение по меньшей мере части превращенной твердой фазы стадии (c) с жидкой фазой стадии (b).

Термин "биомасса", используемый в настоящем изобретении, относится к любому типу биомассы, известному специалисту в данной области техники, подходящему для способа изобретения. Особенно предпочтительной является биомасса растительного происхождения. В другом предпочтительном варианте осуществления исходное содержание сухого вещества биомассы выбирают от 10 до 100 мас.%, более предпочтительно от 35 до 95 мас.% и особенно предпочтительно от 40 до 80 мас.%. Термин "сухое вещество" (с.в.) относится к отношению массы к биомассе, определенному после удаления воды и других летучих соединений из свежих тканей с помощью ИК-баланса. При этом особенно предпочтительно выбирать биомассу, сухое вещество которой содержит по меньшей мере 25 мас.% сахаридов, таких как мономерные сахара, димерные сахара и олигосахариды и/или полисахариды, более предпочтительно по меньшей мере 40 мас.%, особенно предпочтительно по меньшей мере 60 мас.%, еще более предпочтительно по меньшей мере 80 мас.% сахаридов, таких как мономерные сахара, димерные сахара и олигосахариды и/или полисахариды. Кроме того, любые смеси подходящих биомасс должны быть включены в понятие "биомасса".

Особенно предпочтительную биомассу выбирают из "биомассы сахарной свеклы" и/или "биомассы

сахарного тростника", и/или "биомассы лигноцеллюлозы". Термин "биомасса сахарной свеклы" относится к полной и необработанной ткани корня *Beta vulgaris*, включая внешнюю кожуру и внутреннюю массу. Сухая ткань *Beta vulgaris* содержит 80 мас.% растворимой сахарозы, тогда как свекловичная пульпа содержит приблизительно 7% пектина, 7% целлюлозы и 7% гемицеллюлозы, 17% арабинозы, 20% глюкозы и 3,5% фруктозы, и 10% белков, при этом все приводится в расчете по отношению к сухому веществу биомассы. Термин "биомасса сахарной свеклы" также включает в себя свекловичную пульпу (свекловичную стружку).

Термин "биомасса сахарного тростника" относится к целым и необработанным стеблям *Saccharum* sp., включая внешнюю кожуру и внутреннюю массу. Сухая ткань *Saccharum* sp. содержит 80 мас.% растворимой сахарозы, тогда как сухой тростниковый жом состоит из приблизительно 70% полимерных сахаров, включая 45% целлюлозы, 23% лигнина и 25% гемицеллюлозы преимущественно в виде ксилана, при этом все приводится в расчете по отношению к сухому веществу биомассы. Термин "биомасса сахарного тростника" также включает в себя жом сахарного тростника (багассу). Особенно предпочтительными являются жом сахарного тростника и солома сахарного тростника.

Термин "биомасса лигноцеллюлозы" относится к остаткам, отходам и/или побочным продуктам лесоводства и сельского хозяйства, пищевой и бумажной промышленности и к коммунальным отходам. В частности, термин "биомасса лигноцеллюлозы", употребляемый в настоящем изобретении, включает солому и/или мякуну зерновых (например, пшеницы, ржи, ячменя, овса), кукурузную солому и/или стебли, травянистые растения, такие как *Sericea lespedeza*, просо (*Panicum virgatum*); слоновую траву (*Miscanthus*; China reed), суданскую траву (*Sorghum sudanense*, *Sorghum drummondii*), арундо тростниковый, древесную кору, древесину, древесные остатки, древесную щепу и/или древесную стружку, плодовую мякоть, стебли риса, банановую кожуру, пустые грозди фруктов и остатки агавы.

Кроме того, биомасса, пригодная для данного способа, представляет собой подстилочный навоз из конюшен, травяные материалы, отходы помола кофейных зерен и отходы маслобойных заводов, такие как рапсовый жмых и сточные воды маслобойных заводов, сырье для изготовления бумаги и сточные воды целлюлозно-бумажных комбинатов, бумажные отходы, остатки овощей и фруктов.

В предпочтительном варианте осуществления способа настоящего изобретения биомассу выбирают из целлюлозы, гемицеллюлозы и/или лигнинсодержащей биомассы.

В особенно предпочтительном варианте осуществления способа настоящего изобретения биомассу выбирают из сахарной свеклы, свекловичной пульпы, сахарного тростника, жома сахарного тростника, соломы сахарного тростника, пшеничной соломы, кукурузы, древесины, семян масличных культур и их смесей.

В еще одном особенно предпочтительном варианте осуществления способа настоящего изобретения биомасса является лигноцеллюлозной биомассой из сельскохозяйственных остатков, таких как пшеничная солома, жом сахарного тростника, листья и стебли сахарного тростника, солома сахарного тростника, кукурузная солома, стебли и их смеси.

Термин "гидролиз", используемый в настоящем изобретении, следует понимать как деполимеризацию полимера путем реакции гидролиза. Реакцию гидролиза следует понимать как расщепление химических связей путем добавления воды. Одним из способов технического осуществления гидролиза является добавление к биомассе ферментов-гидролаз.

Предпочтительно, благодаря способу гидролиза биомассы по настоящему изобретению сахарады получают из материала биомассы, при этом особенно предпочтительно, чтобы по меньшей мере 50 мас.% полученных сахаридов находилось в форме мономерных и димерных сахаров, предпочтительно по меньшей мере 65 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 75 мас.%, также предпочтительно по меньшей мере 85 мас.% и наиболее предпочтительно 99 мас.%, при этом все приводится в расчете по отношению к сухому веществу биомассы. Кроме того, можно получать аминокислоты, олигопептиды и олигосахариды и/или белки из материала биомассы при применении способа гидролиза биомассы по настоящему изобретению.

Биомассу предпочтительно промывают перед тем, как подвергнуть ее ферментативной обработке, и промывочную воду удаляют перед дальнейшей обработкой. Кроме того, предпочтительно получать биомассу в виде частиц, например, с помощью резки, помола, истирания, сдвига, диспергирования со сдвигом, рубки, диспергирования и/или смешивания биомассы перед стадией (а). В дополнительном варианте осуществления биомасса может быть подвергнута предварительной обработке перед стадией (а) способа по изобретению.

Способы, подходящие для предварительной обработки биомассы, включают любой вид механических, биологических, химических и/или физических способов предварительной обработки, известных специалисту в данной области. В предпочтительном варианте осуществления способ предварительной обработки выбирают из способов механического измельчения, обработки кислотами и/или щелочами, влажного окисления, гидротермолиза с регулированием pH и/или парового взрыва.

"Паровой взрыв" согласно настоящему изобретению предпочтительно включает гидротермическую обработку под давлением при температуре от 60 до 350°C, предпочтительно от 80 до 300°C, особенно предпочтительно от 100 до 250°C и наиболее предпочтительно от 110 до 220°C содержащего лигноцел-

люлозу материала в присутствии или отсутствии кислотных (таких как  $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ,  $H_3PO_4$ ) или основных/щелочных (т.е.  $NH_4OH$ ,  $NaOH$ ,  $KOH$ , извести) катализаторов, которые, если присутствуют, добавляются в концентрации 0,01-15% (мас./мас.), предпочтительно 0,05-12,5% (мас./мас.), более предпочтительно 0,1-10% (мас./мас.) и наиболее предпочтительно 0,25-7,5% (мас./мас.). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения давление предпочтительно выбирают от 1 до 100 бар (0,1-10,0 МПа), предпочтительно от 2 до 50 бар (0,2-5,0 МПа), также предпочтительно от 3 до 25 бар (0,3-2,50 МПа) и наиболее предпочтительно от 5 до 15 бар (0,5-1,50 МПа). Время реакции в ходе парового взрыва должно быть выбрано от 10 с до 2 ч, предпочтительно от 1 мин до 1,5 ч и наиболее предпочтительно от 5 мин до 1 ч для обеспечения эффективного превращения компонентов биомассы при подготовке для ферментативного гидролиза. В особенно предпочтительном варианте осуществления предварительная обработка "механическим измельчением" содержащего лигноцеллюлозу материала осуществляется перед или во время предварительной обработки паровым взрывом, при этом механическое измельчение выбирают из группы, состоящей из механической обработки, истирания, рубки, дробления, резки, облучения, помола и их сочетаний.

"Предварительная обработка кислотой" в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой непрерывную обработку разбавленной и/или слабой кислотой, такую как обработка серной кислотой или другими органическими кислотами, такими как уксусная кислота, лимонная кислота, винная кислота, янтарная кислота, хлористый водород или их смеси. Могут также использоваться и другие кислоты. Следует понимать, что "обработку слабой кислотой" согласно настоящему изобретению осуществляют при pH от 0,1 до 5, предпочтительно от 2 до 3 (применительно к материалу, содержащему лигноцеллюлозу). В предпочтительном варианте осуществления кислоту добавляют в концентрациях 0,01-15% (мас./мас.), предпочтительно 0,05-12,5% (мас./мас.), более предпочтительно 0,1-10% (мас./мас.) и наиболее предпочтительно 0,25-7,5 мас.%. Кислота предпочтительно является серной кислотой. Кислота может приводиться в контакт с биомассой при температуре 120-280°C, предпочтительно 135-225°C и наиболее предпочтительно 150-200°C в течение периода времени от 1 до 60 мин, предпочтительно от 2 до 30 мин и наиболее предпочтительно от 5 до 15 мин. Добавление сильных кислот, таких как серная кислота, может применяться в особенно предпочтительных вариантах осуществления для удаления гемицеллюлозы.

"Химическая предварительная обработка" в соответствии с настоящим изобретением также относится к обработке биомассы  $H_2O_2$ , озоном, кислотами Льюиса,  $FeCl_3$ ,  $Al_2(SO_4)_3$  в водных спиртах, глицерине, диоксане, феноле, этиленгликоле,  $NaOH$ ,  $Na_2CO_3$  и/или аммиаке. Предпочтительные концентрации, температуру и продолжительность выбирают аналогично указанным выше условиям применительно к предварительной обработке кислотой.

"Предварительная обработка влажным окислением" в соответствии с настоящим изобретением включает использование окислителей, таких как окислители на основе сульфита.

Термин "механическое измельчение" относится к любой механической обработке, которая способствует отделению и/или высвобождению целлюлозы, гемицеллюлозы и/или лигнина из биомассы.

Механическое измельчение предпочтительно выбирают из группы, состоящей из механической обработки, истирания, рубки, дробления, резки, облучения, помола, такого как сухой помол, мокрый помол, виброшаровой помол и их сочетаний.

"Биологическая предварительная обработка" согласно настоящему изобретению относится к любой биологической предварительной обработке, которая способствует отделению и/или высвобождению целлюлозы, гемицеллюлозы и/или лигнина из биомассы. Способы биологической предварительной обработки могут включать применение солибилизирующих лигнин микроорганизмов, таких как актиномицеты (например, штаммы *Streptomyces*) или грибки калины.

Способы предварительной обработки, подходящие для способа настоящего изобретения, должны проводиться в подходящих устройствах, известных специалисту в данной области. Устройством, подходящим для проведения химической предварительной обработки, может быть сосуд любого типа, такой как реактор периодического действия. Устройством, подходящим для проведения парового взрыва, может быть сосуд любого типа, такой как реактор периодического действия, но может также осуществляться в шнековом реакторе, предпочтительно в шнековом реакторе непрерывного действия.

При этом особенно предпочтительно, чтобы способ предварительной обработки выбирали из способов, не включающих добавления какой-либо кислоты и/или щелочей, поскольку использование этих веществ приведет к образованию соединений, ингибирующих ферменты и/или микроорганизмы, используемые во время гидролиза и/или ферментации.

Содержание сухого вещества предварительно обработанной биомассы предпочтительно выбирают от 20 до 60 мас.%, особенно предпочтительно от 35 до 50 мас.%, при этом наиболее предпочтительно, чтобы биомасса предварительно обрабатывалась способом, не включающим добавления какой-либо кислоты и/или щелочей.

Однако особое преимущество способа гидролиза биомассы заключается также в том, что применение относительно крупных и/или не прошедших предварительную обработку частиц биомассы будет по-прежнему давать благоприятные результаты. Размер частиц биомассы предпочтительно является таким,

что по меньшей мере 90 мас.% частиц имеют максимальную длину 200 мм, более предпочтительно 100 мм, еще более предпочтительно 50 мм и наиболее предпочтительно 25 мм. Кроме того, предпочтительно, чтобы размер частиц биомассы был предпочтительно таким, что по меньшей мере 95 мас.% частиц имеет максимальную длину 200 мм, более предпочтительно 100 мм, еще более предпочтительно 50 мм и наиболее предпочтительно 25 мм.

На стадии а) способа гидролиза биомассы биомасса приводится в контакт с ферментной композицией, содержащей по меньшей мере один фермент, выбранный из класса гидролаз.

Термин "контактирование", используемый в способе гидролиза биомассы, включает любой вид контактирования биомассы с ферментной композицией, известный специалисту в данной области техники как подходящий для способа изобретения. В предпочтительном варианте осуществления "контактирование" биомассы с ферментной композицией осуществляется с помощью добавления ферментной композиции в биомассу. Кроме того, особенно предпочтительно, чтобы добавление ферментной композиции сопровождалось или проводилось одновременно со смешиванием ферментной композиции с биомассой.

Термин "ферментная композиция", используемый в настоящем изобретении для способа гидролиза биомассы, относится к любой композиции, содержащей по меньшей мере один фермент, выбранный из класса гидролаз. По меньшей мере один фермент, выбранный из класса гидролаз, составляет предпочтительно от 1 до 99,99 мас.% (относительно массы ферментной композиции), более предпочтительно от 5 до 99 мас.%, особенно предпочтительно от 10 до 95 мас.% и наиболее предпочтительно от 20 до 90 мас.% и может дополнительно содержать по меньшей мере один фермент, выбранный из класса лиаз. В вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых ферментная композиция содержит по меньшей мере один фермент, выбранный из класса лиаз, по меньшей мере один фермент, выбранный из класса гидролаз, предпочтительно составляет от 0,01 до 50 мас.% (относительно массы ферментной композиции), предпочтительно от 0,05 до 20 мас.%, более предпочтительно от 0,08 до 5 мас.% и наиболее предпочтительно от 0,1 до 1 мас.%.

В предпочтительном варианте осуществления способа настоящего изобретения для гидролиза биомассы ферментная композиция содержит целлюлазы, гемицеллюлазы и/или пектиназы.

В особенно предпочтительном варианте осуществления способа гидролиза биомассы ферментная композиция содержит по меньшей мере одну целлобиогидролазу (ЕС 3.2.1.-) и по меньшей мере одну эндо-1,4-β-глюканазу (ЕС 3.2.1.4).

В особенно предпочтительном варианте осуществления способа гидролиза биомассы ферментная композиция содержит по меньшей мере одну целлобиогидролазу (ЕС 3.2.1.-), по меньшей мере одну эндо-1,4-β-глюканазу (ЕС 3.2.1.4), по меньшей мере одну β-глюкозидазу (ЕС 3.2.1.4), по меньшей мере одну гликозидгидролазу 61 (GH61 и СВМ33), по меньшей мере одну эндоксилазу (ЕС 3.2.1.8) и по меньшей мере одну β-ксилозидазу (ЕС 3.2.1.37).

В особенно предпочтительном варианте осуществления определенная выше ферментная композиция также содержит один или более ферментов, выбранных из β-глюканазы (ЕС 3.2.1.-), ацетилксиланэстеразы (ЕС 3.1.1.72), ацетилгалактанэстеразы (3.1.1.6), α-арабинопиранозидазы (3.2.1.-), α-галактозидазы (ЕС 3.2.1.22), β-галактозидазы (ЕС 3.2.1.23), α-глюкуро니다з (ЕС 3.2.1.139), β-манназы (ЕС 3.2.1.78), пектинметилэстеразы (ЕС 3.1.1.11), пектинацетилэстеразы (ЕС 3.1.1.-), рамногалактуроназы (ЕС 3.2.1.-; GH28), рамногалактуронанэцетилэстеразы (ЕС 3.1.1.86), рамногалактуронанэндолиазы (ЕС 4.2.2.23), рамногалактуронанлиазы (ЕС 4.2.2.-) и β-маннозидаз (ЕС 3.2.1.25), полигалактуроназ (ЕС 3.2.1.15, 67, 82; GH28) и пектин-/пектатлиаз (ЕС 4.2.2.2, 6, 9, 10).

Термины "целлюлазы", "гемицеллюлазы" и "пектиназы", используемые в настоящем изобретении для способа гидролиза биомассы, относятся к любой смеси ферментов, которая участвует в гидролитическом разложении (деполимеризации) полимерной целлюлозы, гемицеллюлозы и/или пектина до мономерных сахаров. Используемые в настоящем документе термины "целлюлазы", "гемицеллюлазы" и "пектиназы" относятся как к природным, так и к не встречающимся в природе смесям, которые включают в себя множество ферментов, продуцируемых организмом, например, нитчатым грибом. "Целлюлазы", "гемицеллюлазы" и "пектиназы" предпочтительно происходят из грибов, таких как члены отделов *Eumycota* и *Oomycota*, включающих, без ограничения, следующие роды: *Aspergillus*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Cephalosporium*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochiobolus*, *Cryptococcus*, *Cyathus*, *Endothia*, *Endothia mucor*, *Fusarium*, *Gilocladium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Myceliophthora*, *Myrothecium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Phanerochaete*, *Podospora*, *Paecilomyces*, *Pyricularia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Schizophyllum*, *Stagonospora*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Thermomyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyocladium*, *Trichophyton*, и *Trametes*. В предпочтительном варианте осуществления нитчатый гриб представляет собой виды *Trichoderma*.

В предпочтительном варианте осуществления ферментной композиции целлюлазы и/или пектиназы происходят из грибкового источника. В особенно предпочтительном варианте осуществления ферментной композиции этот грибковый источник представляет собой *Trichoderma reesei*.

Термин "смесь ферментов" предпочтительно относится к смеси ферментов, выделяемой из одного или более микробиологических источников. В некоторых вариантах осуществления ферменты для ис-

пользования в этой смеси (смесях) ферментов могут быть получены из одного или более природных или генно-инженерных штаммов нитчатых грибов. Предпочтительные штаммы перечислены выше. Желаемое соотношение ферментных компонентов в конечной смеси (смесях) может быть достигнуто путем изменения относительного количества фермента в конечной смеси, например, путем добавления очищенного или частично очищенного фермента (ферментов). В некоторых вариантах осуществления конечная смесь (смеси) может быть дополнена одной или более ферментными активностями, которые не экспрессируются эндогенно или экспрессируются на относительно низком уровне нитчатыми грибами, чтобы улучшить разложение целлюлозного субстрата до поддающихся ферментации сахаров. Дополнительный фермент (ферменты) могут быть добавлены в качестве добавки в конечную смесь (смеси), и ферменты могут быть компонентом отдельного полного ферментационного бульона или могут быть очищены, или минимально выделены и/или очищены.

Используемый в способе гидролиза биомассы термин "целлюлаза" относится к любому ферменту, способному гидролизовать полимеры целлюлозы в более короткие олигомеры и/или глюкозу. Целлюлазы, предпочтительные в ферментной композиции, включают целлобиогидролазы (СВН) (ЕС 3.2.1.-), эндо-1,4-β-глюканазы (EG) (ЕС 3.2.1.4), β-глюкозидазу (ЕС 3.2.1.4), целлобиозогидролазу (ЕС 3.2.1.21), гликозидгидролазу 61 (GH61 и СМВ33), экспансин, сволленин, лузинин и С1Р белки (ЕС 3.1.1.-; СЕ15).

Используемый в способе гидролиза биомассы термин "гемицеллюлаза" относится к любому ферменту, способному разлагать или поддерживать разложение гемицеллюлозы. Гемицеллюлазы, предпочтительные в ферментной композиции, включают β-глюканазы (ЕС 3.2.1.-), эндоксилазы (ЕС 3.2.1.8), β-ксилозидазы (ЕС 3.2.1.37), ацетилксиланэстеразу (ЕС 3.1.1.72), ацетилгалактанэстеразу (3.1.1.6), ацетилманнанэстеразу, ферулоилэстеразу (ЕС 3.1.1.73), глюкуроноилэстеразу (ЕС 3.1.1.-), α-L-арабинофуранозидазу (3.2.1.55), α-арабинопиранозидазу (3.2.1.-), α-галактозидазу (ЕС 3.2.1.22), β-галактозидазу (ЕС 3.2.1.23), α-глюкуронидазы (ЕС 3.2.1.139), β-манназу (ЕС 3.2.1.78), β-маннозидазы (ЕС 3.2.1.25), маннан-1,4-маннобиозидазу (ЕС 3.2.1.100), арабиногалактан эндо-β-1,4-галактаназу (ЕС 3.2.1.89), эндо-β-1,3-галактаназу (ЕС 3.2.1.90), галактан эндо-β-1,3-галактаназу (ЕС 3.2.1.181), глюкуроноарабиноксилан эндо-1,4-β-ксилазу (ЕС 3.2.1.136), альфа-L-фукозидазу (ЕС 3.2.1.51), кониферин-β-глюкозидазу (ЕС 3.2.1.126), ксилоглюкангидролазы (ЕС 3.2.1.150, 151, 155), ксилан-α-1,2-глюкуронозидазу (ЕС 3.2.1.131), эндоксилогалактуронангидролазу (ЕС 3.2.1.-; GH28), α-амилазу (ЕС 3.2.1.1), глюкан-1,4-α-глюкозидазу (ЕС 3.2.1.3), галактан-1,3-галактозидазу (GH43), -1,4-, эндогалактаназу (ЕС 3.5.1.89; GH53), α-рамнозидазу (ЕС 3.2.1.40), β-рамнозидазу (ЕС 3.2.1.43), лигнинпероксидазу (ЕС 1.11.1.14), Мп-пероксидазу (ЕС 1.11.1.13), арилалкогольоксидазу (ЕС 1.1.3.7), глиоксальоксидазу (ЕС 1.1.3.), углеводоксидазы (ЕС 1.1.3.4, 9, 10), лакказы (ЕС 1.10.3.2) и целлобиозодегидрогеназу (ЕС 1.1.99.18).

Используемый в способе гидролиза биомассы термин "пектиназа" относится к любому ферменту, способному разлагать или поддерживать разложение пектина. Пектиназы, предпочтительные в ферментной композиции, включают полигалактуроназы (ЕС 3.2.1.15, 67, 82; GH28), пектин-/пектатлиазы (ЕС 4.2.2.2, 6, 9, 10), пектинметилэстеразу (ЕС 3.1.1.11), пектинацетилэстеразу (ЕС 3.1.1.-), рамногалактуроназу (ЕС 3.2.1.-; GH28), рамногалактуронанацетилэстеразу (ЕС 3.1.1.86), рамногалактуронанэндолиазу (ЕС 4.2.2.23), рамногалактуронанлиазу (ЕС 4.2.2.-), рамногалактуронан-галактуронгидролазу (ЕС 3.2.1.-), ксилогалактуронангидролазу (ЕС 3.2.1.-), пектинметилэстеразу (ЕС 3.1.1.11), β-арабинофуранозидазу (ЕС 3.2.1.55), β-1,4-галактаназу (ЕС 3.2.1.89), β-1,3-галактаназу (ЕС 3.2.1.90), β-галактозидазу (ЕС 3.2.1.23), альфа-галактозидазу (ЕС 3.2.1.22), ферулоилацетилэстеразу (ЕС 3.1.1.-), альфа-фукозидазу (ЕС 3.2.1.51), (β-фукозидазу) (ЕС 3.2.1.38), β-апиозидазу (ЕС 3.2.1.-), альфа-рамнозидазу (ЕС 3.2.1.40), β-рамнозидазу (ЕС 3.2.1.43), альфа-арабинопиранозидазу (ЕС 3.2.1.-), β-глюкуронидазу (ЕС 3.2.1.31), альфа-глюкуронидазу (ЕС 3.2.1.139), β-ксилозидазу (ЕС 3.2.1.37) и альфа-ксилозидазу (ЕС 3.2.1.x).

Ферменты, указанные в настоящем изобретении для способа гидролиза биомассы, классифицируются в соответствии с номенклатурами, которые основаны на номенклатуре и классификации ферментов Международного союза биохимии и молекулярной биологии (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) или на базе данных ферментов, активных в отношении углеводов (Carbohydrate-Active EnZymes, <http://www.cazy.org/>).

Термин "активность фермента", используемый в настоящем изобретении для способа гидролиза биомассы, относится к каталитической активности фермента в соответствующих условиях, при которых фермент служит в качестве белкового катализатора, который преобразует специфические полимерные или искусственные субстраты в специфические олигомерные или мономерные продукты. В этом контексте термин "соответствующие условия" хорошо известен и применяется специалистами в данной области.

"Контактирование" в соответствии со стадией (а) способа по изобретению может быть осуществлено любым известным специалисту способом, подходящим для целей изобретения. При этом предпочтительно, чтобы смесь ферментов добавлялась к биомассе при перемешивании биомассы внутри сосуда. Фермент (ферменты) могут также быть иммобилизованы на материале носителя.

Ферменты могут использоваться в разных относительных соотношениях в данной смеси. При этом

особенно предпочтительно использовать ферментную композицию с E/S отношением (отношением фермента к субстрату) от 0,05 до 1,5 мас.%, предпочтительно от 0,1 до 0,75 мас.%.

Кроме того, предпочтительно, чтобы способ настоящего изобретения, особенно стадия гидролиза, не включала использования кислотных и/или щелочных веществ, поскольку использование этих веществ приведет к образованию соединений, ингибирующих ферменты и/или микроорганизмы, используемые во время гидролиза и/или ферментации. Кроме того, кислота (кислоты) и/или щелочь (щелочи) не только будут гидролизовать гликозидные связи, но также будут реагировать с молекулами глюкозы и ксилозы, уже присутствующими в гидролизате, с образованием нежелательных соединений, таких как гидроксиметилфурфурол и фурфурол.

Кроме того, большие количества кислот, особенно соляной кислоты, могут даже препятствовать использованию оборудования из нержавеющей стали, такого как сосуды, реакторы и трубы, и требуют использования большого количества нейтрализующих веществ, которые опять же будут увеличивать количество нежелательных солей в гидролизате.

В предпочтительном варианте осуществления стадия (а) способа гидролиза биомассы осуществляется в течение периода времени, достаточного для гидролиза по меньшей мере 20 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 30 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 50 мас.% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 60 мас.% биомассы. В другом предпочтительном варианте осуществления способа настоящего изобретения стадия (а) осуществляется в течение периода времени, достаточного для гидролиза от 10 до 100 мас.%, предпочтительно от 20 до 90 мас.%, еще более предпочтительно от 30 до 85,0 мас.% и наиболее предпочтительно от 40 до 75 мас.% целлюлозы биомассы. В настоящем изобретении термин "гидролиз" следует понимать как гидролитическое превращение нерастворимых полимерных компонентов биомассы в растворимые мономерные, димерные и/или олигомерные соединения с помощью химических, физических и/или ферментативных процессов, таких как гидролиз.

В особенно предпочтительном варианте осуществления стадия (а) способа гидролиза биомассы осуществляется от 1 мин до 112 ч, более предпочтительно от 30 мин до 100 ч, особенно предпочтительно от 1 до 96 ч, еще более предпочтительно от 4 до 85 ч, также особенно предпочтительно от 12 до 72 ч.

В другом предпочтительном варианте осуществления стадия (а) способа гидролиза биомассы осуществляется до тех пор, пока содержание остающихся нерастворимых твердых веществ не составит менее 40 мас.%, предпочтительно менее 30 мас.%, еще более предпочтительно менее 20 мас.% и наиболее предпочтительно менее 15 мас.%. В еще одном предпочтительном варианте осуществления стадия (а) способа гидролиза биомассы осуществляется до тех пор, пока содержание остающихся нерастворимых твердых веществ не составит от 5 до 40 мас.%, предпочтительно от 8 до 30 мас.% и наиболее предпочтительно от 10 до 25 мас.%.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения способа гидролиза биомассы стадия (а) осуществляется до тех пор, пока биомасса не будет переведена в жидкое состояние до по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%, при этом ожигание от 60 до 90% является особенно предпочтительным.

Температуру реакции во время стадии а) предпочтительно выбирают от 25 до 80°C, более предпочтительно выбирают от 30 до 75°C и особенно предпочтительно от 35 до 65°C. В другом предпочтительном варианте осуществления стадия (а) способа гидролиза биомассы осуществляется в течение периода времени от 1 до 80 ч, предпочтительно от 2 до 70 ч, более предпочтительно от 3 до 60 ч, при этом температуру выбирают от 35 до 75°C или от 45 до 65°C.

В другом предпочтительном варианте осуществления рН во время стадии а) предпочтительно выбирают от 4 до 16, особенно предпочтительно от 4,5 до 5,5.

Соответствующие уровни дозировки и рабочие условия будут очевидны специалистам в данной области техники, особенно в свете приведенного здесь подробного описания. Оптимальные уровни дозировки полного ферментационного бульона будут значительно варьировать в зависимости от субстрата и используемых технологий предварительной обработки. Ферментную композицию предпочтительно добавляют в биомассу в количестве от 0,1 до 24 мас.% сухого вещества биомассы, более предпочтительно от 0,25 до 12 мас.% сухого вещества биомассы, особенно предпочтительно от 0,5 до 6 мас.% сухого вещества биомассы, и наиболее предпочтительно от 0,1 до 0,6 мас.% сухого вещества биомассы. Общую концентрацию фермента (белка) определяли по методу Бредфорд с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве эталона для сравнения (Bradford, M., 1976).

Стадию (а) способа гидролиза биомассы осуществляют в сосуде любого типа, известного специалисту в данной области техники в качестве подходящего для технологии изобретения, предпочтительно внутри реактора. Подходящие реакторы известны специалистам в данной области. Предпочтительные сосуды/реакторы включают, без ограничения, сосуды/реакторы, содержащие перемешивающее средство и/или средство для перекачивания или рециркуляции содержимого биомассы внутри реактора. Дополнительные предпочтительные средства предпочтительных реакторов включают, без ограничения, средства для контроля температуры и/или рН и для регулирования температуры и/или рН.

После стадии (а) способа по изобретению твердую и жидкую фазы разделяют в соответствии со стадией (b) способа по изобретению. Разделение твердой и жидкой фаз может осуществляться любым

известным специалисту способом, подходящим для целей изобретения, и предпочтительно осуществляется с помощью фильтрации, центрифугирования, декантации или отжима, например, с помощью шнекового пресса.

Температура жидкой фазы предпочтительно является такой же, как и температура во время контактирования на стадии (а) способа по изобретению. В особенно предпочтительном варианте осуществления температуру жидкой фазы выбирают от 25 до 60°C, более предпочтительно от 30 до 55°C. В том случае, если температура отделенной жидкой фазы оказывается ниже температуры во время контактирования на стадии (а), жидкую фазу предпочтительно охлаждают путем транспортировки жидкой фазы через теплообменник после отделения от твердой фазы на стадии (b) способа по изобретению.

В соответствии со стадией (с) способа по изобретению осуществляется ферментативное превращение отделенной твердой фазы. Также можно конвертировать твердую фазу с помощью использования ферментов, по-прежнему присутствующих в материале. Это особенно предпочтительно в том случае, когда ферменты, добавляемые во время стадии (а) способа, имеют склонность к иммобилизации на твердых частицах, присутствующих внутри твердой фазы. Однако можно также добавлять дополнительные ферменты во время стадии (с). В случае добавления ферментов можно добавлять те же самые или же другие ферменты по сравнению со стадией (а).

В особенно предпочтительном варианте осуществления температуру во время стадии (с) предпочтительно выбирают от 25 до 80°C, более предпочтительно от 30 до 75°C и наиболее предпочтительно от 35 до 65°C.

В другом предпочтительном варианте осуществления рН во время стадии (с) предпочтительно выбирают от 4 до 16, особенно предпочтительно от 4,5 до 5,5.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления стадия (с) предпочтительно осуществляется в течение по меньшей мере 30 мин, более предпочтительно в течение по меньшей мере 60 мин, еще более предпочтительно в течение по меньшей мере 90 мин и наиболее предпочтительно в течение по меньшей мере 120 мин перед объединением по меньшей мере части твердой фазы в соответствии со стадией (d) с жидкой фазой. При этом особенно предпочтительно, чтобы стадия (с) осуществлялась от 1 мин до 112 ч, более предпочтительно от 30 мин до 100 ч, особенно предпочтительно от 1 до 96 ч, еще более предпочтительно от 4 до 85 ч, также особенно предпочтительно от 12 до 72 ч.

В особенно предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере один фермент, выбранный из класса гидролаз, добавляют в твердую фазу. При этом термин "гидролазы" определяется, как описано ранее. В объеме настоящего изобретения можно добавлять одинаковые или разные гидролазы на стадии (а) и стадии (с).

В другом предпочтительном варианте осуществления некоторое количество жидкости, предпочтительно H<sub>2</sub>O, добавляют в твердую фазу перед или во время стадии (с). Это количество предпочтительно выбирают таким образом, чтобы гарантировать конечное содержание сухого вещества твердой фазы 15-35%, предпочтительно 18-30% и наиболее предпочтительно 20-25%.

Применительно к ферментативному превращению в соответствии со стадией (с), также можно выбрать такие же или же другие условия, параметры и концентрации, как было определено выше в отношении стадии (а) способа. Соответствующим образом применяются одинаковые определения.

В другом предпочтительном варианте осуществления способа настоящего изобретения разделение твердой и жидкой фаз осуществляется после стадии (с). При этом только отделенная жидкая фаза будет подаваться к превращенной твердой фазе стадии (d). Разделение твердой и жидкой фаз предпочтительно осуществляют с использованием фильтр-пресса.

В соответствии со стадией (d) способа по изобретению по меньшей мере часть превращенной твердой фазы стадии (с) объединяют с жидкой фазой стадии (b). Выражение "превращенная твердая фаза" при этом следует понимать как твердую фазу, отделенную в соответствии со стадией (b), которая уже подвергалась ферментному превращению по меньшей мере 1 мин, предпочтительно по меньшей мере 30 мин, более предпочтительно по меньшей мере 1 ч, особенно предпочтительно по меньшей мере 4 ч, также предпочтительно по меньшей мере 6 ч и наиболее предпочтительно по меньшей мере 12 ч. При этом особенно предпочтительно, чтобы ферментное превращение осуществлялось в течение периода времени от 4 до 108 ч, предпочтительно от 6 до 96 ч и наиболее предпочтительно от 12 до 72 ч.

В особенно предпочтительном варианте осуществления способа настоящего изобретения "объединение" в соответствии со стадией (d) осуществляется с помощью подачи по меньшей мере части превращенной твердой фазы в жидкую фазу стадии (b), при этом особенно предпочтительно, чтобы от 10 до 100 мас.%, предпочтительно от 20 до 100 мас.%, более предпочтительно от 50 до 100 мас.% "превращенной твердой фазы" подавалось в жидкую фазу в соответствии со стадией (d). Однако в объем настоящего изобретения также входит объединение, которое осуществляется путем подачи жидкой фазы в преобразованную твердую фазу или путем одновременного комбинирования обеих фаз.

При этом предпочтительно подавать превращенную твердую фазу непрерывно или путем однократного добавления в жидкую фазу. Если превращенную твердую фазу подают непрерывно, по меньшей мере 10 мас.% превращенной твердой фазы подается в жидкую фазу за 1 ч, предпочтительно по меньшей мере 20 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 30 мас.%. При этом также предпочти-

тельно, чтобы от 10 до 50 мас.%, предпочтительно от 15 до 45 мас.% превращенной твердой фазы подавалось в жидкую фазу за 1 ч. Если "превращенная твердая фаза" стадии (с) подается на стадию (d) непрерывным образом, подача может начинаться непосредственно после стадии (с) способа по изобретению, или же начинаться в пределах периода времени от 1 с до 144 ч, предпочтительно от 1 мин до 122 ч, еще предпочтительнее от 1 до 96 ч, более предпочтительно от 6 до 72 ч и наиболее предпочтительно от 12 до 48 ч. Особенно предпочтительно подавать от 15 до 45 мас.% превращенной твердой фазы в час и начинать подачу через 12-48 ч после стадии (с).

При этом подача осуществляется любым известным специалисту способом, подходящим для способа по изобретению, таким как закачка части указанной биомассы по трубопроводу.

При этом термин "объем реакционной смеси" относится к общему объему биомассы и ферментной композиции, присутствующему в сосуде.

В особенно предпочтительном варианте осуществления подачу в соответствии со стадией (d) предпочтительно осуществляют с помощью использования теплообменника. При использовании теплообменника можно не только рекуперировать и рециркулировать тепловую энергию процесса ферментативного превращения, но обработанный таким образом материал будет также охлажден до температуры, более благоприятной для необязательной последующей ферментации. Термин "теплообменник" хорошо известен специалисту в данной области техники и включает любое устройство, известное специалисту, которое подходит для цели изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления способа гидролиза биомассы стадии (a)-(d) повторяют по меньшей мере один раз для обеспечения максимально возможного выхода желаемых соединений биомассы. В особенно предпочтительном варианте осуществления стадии (a)-(d) повторяют от 2 до 100000 раз, предпочтительно от 10 до 70000 раз, более предпочтительно от 15 до 50000 раз и наиболее предпочтительно от 17 до 10000 раз. В объем настоящего изобретения входит стадия очистки сосуда и/или любой другой части системы, осуществляемая в любое время между или после стадий (a)-(d). Очистка может быть выполнена любым способом, известным специалисту в данной области техники, подходящим для цели изобретения, и может также включать в себя замену одной или более частей системы.

В другом особенно предпочтительном способе стадии (a)-(d), по меньшей мере, частично осуществляются одновременно и/или непрерывно.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления способа по изобретению, ферментную композицию, добавляемую в биомассу, добавляют в количестве от 0,1 до 3 мас.% сухого вещества биомассы, и стадию (b) способа начинают через 5-100 ч. В другом особенно предпочтительном варианте осуществления способа ферментная композиция, добавляемая в биомассу, присутствует в количестве от 0,25 до 2 мас.% сухого вещества биомассы, и стадию (b) способа начинают через 10-72 ч.

В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере один ферментирующий организм добавляют в жидкую фазу до, во время или после стадии (d) способа, тогда как в особенно предпочтительном варианте осуществления ферментирующий организм добавляют в жидкую фазу до или во время стадии (d) способа.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления температуру во время добавления по меньшей мере одного ферментирующего организма выбирают от 10 до 65°C, предпочтительно от 15 до 55°C, особенно предпочтительно от 20 до 50°C, наиболее предпочтительно от 25 до 45°C.

Особенно предпочтительным ферментирующим организмом являются мезофильные дрожжи, такие как все виды рода *Saccharomyces*, особенно *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 *Torulaspora delbrueckii*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces lipofer*, *Cryptococcus albidus*, и их смеси.

В альтернативном варианте осуществления способа по изобретению по меньшей мере один ферментирующий организм выбирают из термофильных микроорганизмов. Примерами термофильных дрожжей, подходящих для способа изобретения, являются *Candida bovina*, *Candida picachoensis*, *Candida emberorum*, *Candida pintolopesii*, *Candida thermophila*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kazachstania telluris*, *Issatchenkia orientalis* и *Lachancea thermotolerans*. Предпочтительные термофильные бактерии включают *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydrosulphuricum*, *Clostridium thermosac-*

charolyticum, Thermoanaerobium brockii, Thermobacteroides acetoethylicus, Thermoanaerobacter ethanolicus, Clostridium thermoaceticum, Clostridium thermoautotrophicum, Acetogenium kivui, Desulfotomaculum nigrificans и Desulfovibrio thermophilus, Thermoanaerobacter tengcongensis, Bacillus stearothermophilus и Thermoanaerobacter mathranii.

Использование следующих мезофильных дрожжей является особенно предпочтительным: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*.

В альтернативном варианте осуществления способа по изобретению по меньшей мере один ферментирующий организм выбирают из грибов. Примерами грибов, подходящих для способа изобретения, являются *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Rhizopus* sp. и *Talaromyces* sp.

В альтернативном варианте осуществления способа по изобретению по меньшей мере один ферментирующий организм выбирают из бактерий. Примерами бактерий, подходящих для способа изобретения, являются *Clostridium acetobutylicum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus* sp., *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*.

В предпочтительном варианте осуществления такие минералы, как медь, цинк, магний, кальций, железо, и такие азотсодержащие соединения, как нитрат, аминокислоты, аммиак, добавляют перед, во время или после добавления по меньшей мере одного ферментирующего организма.

Ценные органические соединения, полученные в результате бактериальной ферментации гидролизата, включают, без ограничения, органические кислоты (такие как уксусная кислота, молочная кислота, янтарная кислота, итаконовая кислота, фумаровая кислота, пропионовая кислота, и глюкуроновая кислота), аминокислоты (такие как глутаминовая кислота, лейцин, лизин, треонин, аспарагиновая кислота, фенилаланин, цистеин), капролактамы (такие как альфа-аминокапролактамы), антибиотики (такие как блеомицин, виргиниамицин, линкомицин, монензин, бластицидин, тетрациклин), витамины (такие как витамин B2, B12 и C), ферменты, нуклеотиды/нуклеозиды (такие как NADH, АТФ, сАМФ, FAD, кофермент А), биогаз, биополимеры (такие как полигидроксибутират, полиамиды/фиброины), белки, полисахариды (такие как ксантановая камедь, декстран), аминоглюканы (такие как гиалуроновая кислота), а также органические растворители и биотоплива (такие как ацетон, этанол, бутанол, пропандиол).

Ценные органические соединения, полученные в результате дрожжевой ферментации гидролизата, включают, без ограничения, органические растворители (например, этанол, пропанол), нуклеотиды (например, РНК), биологические поверхностно-активные вещества (например, софорозные липиды), ферменты и биополимеры (например, спидроины).

Ценные органические соединения, образующиеся в результате грибковой ферментации гидролизата, содержат органические кислоты (такие как лимонная кислота, фумаровая кислота, итаконовая кислота), антибиотики (такие как пенициллин, цефалоспорин), ферменты и полисахариды (такие как хитин).

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

Основное преимущество способа настоящего изобретения заключается в том, что способ может осуществляться в виде непрерывного процесса, при этом особенно предпочтительно, чтобы по меньшей мере два цикла процесса [цикл v1n1, цикл v2n1] начинались параллельно или с интервалом между ними. При этом переменная "v" указывает на отдельный цикл, а переменная "n" указывает на повторение этого цикла. Например, способ согласно изобретению, включающий три цикла и осуществляющий 100 повторов (для каждого цикла), будет определяться использованием переменных от v1n1, v2n1, v3n1 до v1n100, v2n100 и v3n100, где, например, 35-й повтор второго цикла будет обозначаться v2n35.

Циклы особенно предпочтительно начинаются с интервалом по меньшей мере 15 мин, предпочтительно по меньшей мере 60 мин, более предпочтительно по меньшей мере 6 ч, особенно предпочтительно по меньшей мере 12 ч, также предпочтительно по меньшей мере 24 ч и наиболее предпочтительно по меньшей мере 48 ч, при этом интервал составляет от 1 до 96 ч, предпочтительно от 5 до 72 ч, также предпочтительно от 6 до 48 ч или особенно предпочтительно от 10 до 24 ч. Соответственно, каждый последующий цикл способа [v2, v3 и т. д.] использует ферментативно превращенную твердую фазу из предыдущей фазы [начиная с v1], как показано на фиг. 1. В случае, если способ изобретения осуществляют в 2 циклах, эти циклы предпочтительно начинаются с интервалом от 24 до 72 ч, предпочтительно от 36 до 48 ч, в случае, если способ изобретения осуществляют в 4 циклах, эти циклы предпочтительно начинаются с интервалом от 12 до 72 ч, предпочтительно от 18 до 24 ч.

Если способ гидролиза биомассы по настоящему изобретению проводится более чем в один цикл, особенно предпочтительно, когда стадии (a) и (c) осуществляются одновременно в течение по меньшей мере 50% периода времени стадии (a), предпочтительно от 50 до 95%, особенно предпочтительно от 60 до 90% и наиболее предпочтительно 70 до 85%. В равной степени предпочтительно, когда стадии (a) и (c) осуществляются одновременно в течение 100% периода времени.

Если способ гидролиза биомассы по настоящему изобретению проводится более чем в один цикл, особенно предпочтительно, когда стадии (a) и (d) осуществляются одновременно в течение по меньшей

мере 50% периода времени стадии (а), предпочтительно от 50 до 95%, особенно предпочтительно от 60 до 90% и наиболее предпочтительно от 70 до 85%. В равной степени предпочтительно, когда стадии (а) и (d) осуществляются одновременно в течение 100% периода времени.

Таким образом, можно осуществлять каждый цикл в одинаковых или различных условиях, в числе прочего, таких как содержание сухого вещества биомассы, используемая ферментная композиция, температура отдельных стадий и т.д.

Ниже описаны особенно предпочтительные варианты осуществления способа, которые не следует рассматривать как ограничивающие изобретение в каком-либо отношении.

Особенно предпочтительный вариант осуществления 1.

Особенно предпочтительным является способ гидролиза соломы и/или жома сахарного тростника, включающий стадии:

а) контактирования биомассы с ферментной композицией, содержащей по меньшей мере одну целлюлозгидролазу (ЕС 3.2.1.-) и по меньшей мере одну эндо-1,4-β-глюканазу (ЕС 3.2.1.4) в сосуде в течение периода времени от 4 до 85 ч, также особенно предпочтительно от 12 до 72 ч;

б) разделения твердой и жидкой фазы;

с) ферментативного превращения твердой фазы в течение периода времени от 4 до 85 ч, также особенно предпочтительно от 12 до 72 ч;

д) подачи по меньшей мере части превращенной твердой фазы стадии (с) в жидкую фазу стадии (б), при этом по меньшей мере один фермент, выбранный из целлюлозгидролазы (ЕС 3.2.1.-) и по меньшей мере одной эндо-1,4-β-глюканазы (ЕС 3.2.1.4), добавляют во время стадии (с) и, при этом подачу в соответствии со стадией (d) осуществляют непрерывно со скоростью подачи от 10 до 20 мас.% в час.

Особенно предпочтительный вариант осуществления 2.

Особенно предпочтительным является способ гидролиза соломы и/или жома сахарного тростника, включающий стадии:

(а) контактирование биомассы с ферментной композицией, содержащей по меньшей мере одну целлюлозгидролазу (ЕС 3.2.1.-), по меньшей мере одну эндо-1,4-β-глюканазу (ЕС 3.2.1.4), по меньшей мере одну β-глюкозидазу (ЕС 3.2.1.4), по меньшей мере одну гликозидгидролазу 61 (GH61 и CBM33), по меньшей мере одну эндоксилазу (ЕС 3.2.1.8) и по меньшей мере одну из β-ксилозидаз (ЕС 3.2.1.37), в сосуде в течение периода времени от 4 до 85 ч, также особенно предпочтительно от 12 до 72 ч;

б) разделение твердой и жидкой фаз;

с) ферментативное превращение твердой фазы в течение периода времени от 4 до 85 ч, также особенно предпочтительно от 12 до 72 ч;

д) подача по меньшей мере части превращенной твердой фазы стадии (с) в жидкую фазу стадии (б), при этом по меньшей мере один фермент ферментной композиции, определенный для стадии (а) выше, добавляют во время стадии (с), и при этом подачу в соответствии со стадией (d) осуществляют непрерывно со скоростью подачи от 10 до 20 мас.% в час.

Особенно предпочтительный вариант осуществления 3.

Особенно предпочтительным является способ гидролиза соломы и/или жома сахарного тростника, как было определено выше относительно особенно предпочтительного варианта осуществления 2, в котором определенная выше ферментная композиция также содержит один или несколько ферментов, выбранных из β-глюканазы (ЕС 3.2.1.-), ацетилксилаэстеразы (ЕС 3.1.1.72), ацетилгалактанэстеразы (3.1.1.6), α-арабинопиранозидазы (3.2.1.-), α-галактозидазы (ЕС 3.2.1.22), β-галактозидазы (ЕС 3.2.1.23), α-глюкуронидаз (ЕС 3.2.1.139), β-манназы (ЕС 3.2.1.78), пектинметилэстеразы (ЕС 3.1.1.11), пектинацетилэстеразы (ЕС 3.1.1.-), рамногалактуроназы (ЕС 3.2.1.-; GH28), рамногалактуронанэцетилэстеразы (ЕС 3.1.1.86), рамногалактуронанэндолиазы (ЕС 4.2.2.23), рамногалактуронанлиазы (ЕС 4.2.2.-) и β-маннозидазы (ЕС 3.2.1.25), полигалактуроназ (ЕС 3.2.1.15, 67, 82; GH28) и пектин-/пектатлиаз (ЕС 4.2.2.2, 6, 9, 10).

Особенно предпочтительный вариант осуществления 4.

Особенно предпочтительным является способ гидролиза соломы и/или жома сахарного тростника, как определено выше относительно любого из особенно предпочтительных вариантов осуществления 1-3, в котором стадия d) осуществляется с помощью объединения превращенной твердой фазы стадии (с) с жидкой фазой стадии (б) в одной партии.

Особенно предпочтительный вариант осуществления 5.

Особенно предпочтительным является способ гидролиза соломы и/или жома сахарного тростника, как определено выше относительно любого из особенно предпочтительных вариантов осуществления 1-4, проводящийся за 2-4 цикла (v1, v2, v3 v4), с 10-100 повторами (от n1 до n100), в котором стадия а) и/или с) осуществляется/осуществляются при 45-55°C, pH 4,5-5,5, в течение 72-108 ч при 40-60 об/мин. Ферментную композицию предпочтительно добавляют при E/S (отношении фермента к субстрату) от 0,1 до 0,75%.

При этом особенно предпочтительно начинать каждый цикл с интервалом от 36 до 72 ч. Кроме того, особенно предпочтительно использовать теплообменник между стадиями с) и d) для охлаждения объединенных постсахарифицированной твердой фазы и пресахарифицированной биомассы до подходящей

температуры ферментации от 25 до 40°C. Ферментацию особенно предпочтительно осуществляют при pH 4,5-5,5, при скорости вращения 150-250 об/мин в течение периода времени от 12 до 72 ч, при этом ферментирующий организм предпочтительно добавляют в количестве от 7,5 до 12,5% (мас./мас.) посевной культуры.

Особенно предпочтительный вариант осуществления 6.

Особенно предпочтительным является способ гидролиза соломы и/или жома сахарного тростника, как определено выше относительно любого из особенно предпочтительных вариантов осуществления 1-5, в котором ферментную композицию добавляют в виде смеси, продуцируемой организмом, например, нитчатым грибом. Гриб предпочтительно представляет собой виды из рода *Trichoderma*, особенно предпочтительно *Trichoderma reesei*. При этом предпочтительно дополнительно добавлять один или более ферментов, выбранных из β-глюканазы (ЕС 3.2.1.-), ацетилксиланэстеразы (ЕС 3.1.1.72), ацетилгалактанэстеразы (3.1.1.6), α-арабинопиранозидазы (3.2.1.-), α-галактозидазы (ЕС 3.2.1.22), β-галактозидазы (ЕС 3.2.1.23), α-глюкуронидаз (ЕС 3.2.1.139), β-манназы (ЕС 3.2.1.78), пектинметилэстеразы (ЕС 3.1.1.11), пектинацетилэстеразы (ЕС 3.1.1.-), рамногалактуроноазы (ЕС 3.2.1.-; GH28), рамногалактуроноацетилэстеразы (ЕС 3.1.1.86), рамногалактуроноэндодолиазы (ЕС 4.2.2.23), рамногалактуроноазиазы (ЕС 4.2.2.-) и β-маннозидаз (ЕС 3.2.1.25), полигалактуроноаз (ЕС 3.2.1.15, 67, 82; GH28) и пектин-/пектатлиаз (ЕС 4.2.2.2, 6, 9, 10), целлюбиогидролазы (ЕС 3.2.1.-), эндо-1,4-β-глюканазы (ЕС 3.2.1.4), β-глюкозидазы (ЕС 3.2.1.4), гликозидгидролазы 61 (GH61 и SVM33), эндоксилаз (ЕС 3.2.1.8), β-ксилозидаз (ЕС 3.2.1.37).

### Примеры и чертежи

Настоящее изобретение теперь будет описано с помощью следующих примеров и чертежей. Примеры и чертежи приводятся только в иллюстративных целях и не должны пониматься как ограничивающие изобретение.

На фиг. 1 представлена диаграмма, иллюстрирующая способ по изобретению, осуществляемый в примере 1.

На фиг. 2 приводится сравнение выходов глюкозы традиционного способа и способа по настоящему изобретению.

На фиг. 3 показана временная шкала плана использования оборудования при осуществлении способа с 4 циклами и 50 повторами.

Пример 1.

Непрерывный способ из двух параллельных циклов [цикл v1, цикл v2], использующий предварительно обработанную биомассу жома сахарного тростника в сочетании с добавлением ферментирующих организмов. Схема показана на фиг. 1.

Контактирование предварительно обработанной паром биомассы жома сахарного тростника в соответствии со стадией (a) [цикл v1] осуществляли в реакторной системе с механическим перемешиванием с устройством регулирования температуры и pH (цикл v1n1 "пресахарификации") при содержании сухого вещества 20 мас.%. Ферментную композицию, содержащую 91,3 мас.% Celluclast® (целлюлаза от *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) и 8,7 мас.% глюкозидазы (49291 Sigma) с отношением фермента к твердой фазе 0,5 мас.% добавляли к биомассе. Ферментативное превращение осуществляли при 50°C, pH 5,0, в течение 48 ч при перемешивании при 50 об/мин. После стадии (a) разделение твердой и жидкой фаз проводили с помощью декантирующей центрифуги для извлечения сахаросодержащей жидкой фазы [цикл v1n1].

Спустя 48 ч параллельную серию [цикл v2] начинали в течение дополнительных 48 ч в таких же условиях, как описаны для цикла v1 (цикл v2n1 "пресахарификации").

Твердая фаза, полученная в цикле v1n1, содержала лигнин и оставшуюся целлюлозу, и подвергалась дальнейшему ферментативному превращению в соответствии со стадией (c) [цикл v1n1] (цикл v1n1 "постсахарификации"). Дальнейшее ферментативное превращение также проводили в реакторной системе с механическим перемешиванием с устройством регулирования температуры и pH. После добавления ферментной композиции, определенной выше применительно к стадии (a) с отношением фермента к твердой фазе 0,5%, и воды для достижения содержания твердого вещества 20% (мас./мас.), ферментативное превращение осуществляли в течение дополнительных 48 ч при 50°C, pH 5,0 и 50 об/мин. После превращения превращенную твердую фазу транспортировали через теплообменное устройство (где температура понижалась до 32°C) в жидкую фазу параллельной серии [цикл v2n1].

Ферментирующий организм добавляли в жидкую фазу [цикл v2n1] и превращенную твердую фазу [цикл v1n1] в биореакторной системе с механическим перемешиванием с устройством регулирования температуры и pH (= сосуд для культивирования) ("Ферментация"). При этом добавляли 10% (мас./мас.) посевной культуры дрожжевого штамма *Saccharomyces cerevisiae* (DSM No: 1333). Были выбраны анаэробные условия при 32°C и pH 5,0 с перемешиванием 200 об/мин в течение 64 ч.

Твердую фазу [цикл v2n1] обрабатывали в таких же условиях, как описано для цикла v1n1 (цикл v2n1 "постсахарификации").

С помощью примера было подтверждено, что способ изобретения приводит к 97,7% гидролизу/сахарификации предварительно обработанной биомассы жома сахарного тростника и может быть включен в параллельно проходящие процессы, чтобы гарантировать эффективное и непрерывное преоб-

разование. Результаты показаны на фиг. 2. Из фиг. 2 видно, что выход этанола значительно повысился по сравнению со стандартным способом известного уровня техники (без постсахарификации твердой фазы в соответствии со стадией с), но в остальном с идентичными условиями способа).

Также может быть подтверждено, что изобретательский замысел подходит для осуществления частично параллельного и непрерывного технологического процесса.

Пример 2.

Непрерывный способ промышленного масштаба из четырех параллельных циклов [цикл v1, цикл v2, цикл v3, цикл v4], осуществляющихся с 49 повторами, с использованием предварительно обработанной биомассы жома сахарного тростника в сочетании с добавлением ферментирующих организмов. Схема показана на фиг. 3. Условия способа были выбраны такими, как было определено ранее применительно к примеру 1, если не указано иное.

Каждый цикл осуществляли с использованием трех различных сосудов (сосуд прессахарификации v1pre, сосуд постсахарификации v1post, сосуд ферментации v1fer).

Временная шкала для каждой стадии способа.

Прессахарификация (стадия (a)) и постсахарификация (стадия (c)) разделялись на следующие подстадии способа:

заполнение реакционного сосуда: 6 ч;

реакция: 48 ч;

опорожнение реакционного сосуда: 6 ч;

CIP (очистка на месте) реакционного сосуда: 4 ч.

Ферментация (включенная в стадию (d) способа):

заполнение реакционного сосуда: 14 ч;

реакция: 48 ч;

опорожнение реакционного сосуда: 6 ч;

CIP реакционного сосуда: 4 ч.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ гидролиза биомассы, включающий стадии:

a) контактирование биомассы с ферментной композицией, содержащей по меньшей мере один фермент, выбранный из класса гидролаз, в сосуде;

b) разделение твердой и жидкой фаз;

c) ферментативное превращение твердой фазы;

d) объединение по меньшей мере части превращенной твердой фазы стадии (c) с жидкой фазой стадии (b);

где по меньшей мере один ферментирующий организм добавляется к жидкой фазе перед или в ходе стадии (d) способа и

от 10 до 100 мас.% превращенной твердой фазы подают в жидкую фазу в соответствии со стадией (d).

2. Способ по п.1, в котором объединение на стадии (d) осуществляется с помощью подачи по меньшей мере части превращенной твердой фазы в жидкую фазу.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором некоторое количество жидкости добавляют в твердую фазу перед или во время стадии (c).

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором по меньшей мере один фермент, выбранный из класса гидролаз, добавляют в твердую фазу.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором от 10 до 100 мас.% твердой фазы подают в жидкую фазу в соответствии со стадией (d) за 1 ч.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором температура на стадии (a) и/или (c) выбрана из диапазона от 25 до 65°C.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором температура жидкой фазы выбрана из диапазона от 25 до 50°C.

8. Способ по любому из пп.2-7, в котором стадию (c) осуществляют в течение по меньшей мере 30 мин перед подачей по меньшей мере части твердой фазы в соответствии со стадией (d).

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором объединение в соответствии со стадией (d) осуществляют с использованием теплообменника.

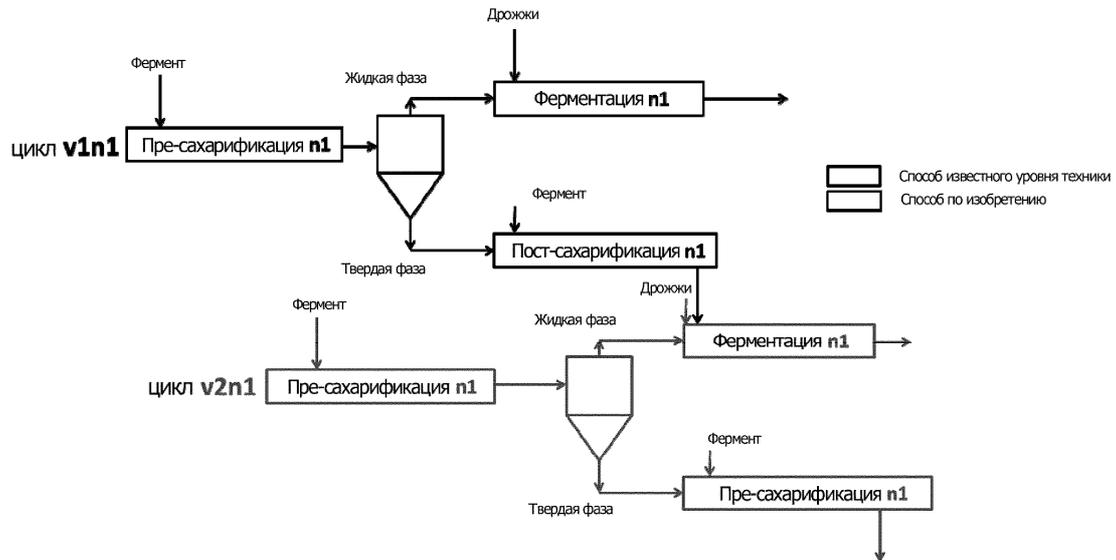
10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадии (a)-(d), по меньшей мере, частично осуществляют одновременно и/или непрерывно.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором ферментная композиция содержит по меньшей мере одну целлюбиогидролазу (ЕС 3.2.1.-) и по меньшей мере одну эндо-1,4-β-глюканазу (ЕС 3.2.1.4).

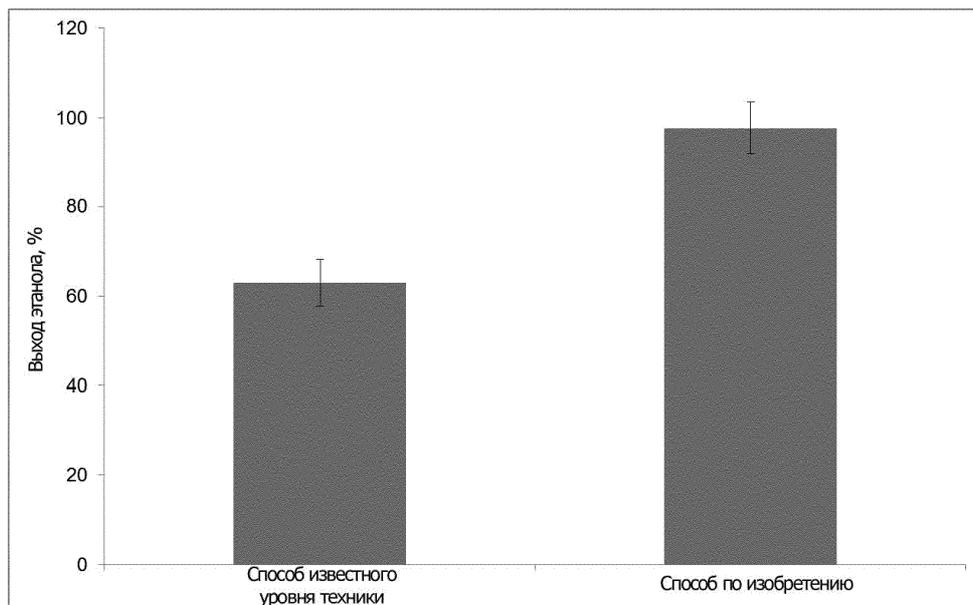
12. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором биомассу выбирают из сахарной свеклы, сахарного тростника, соломы сахарного тростника, свекловичной пульпы, жома сахарного тро-

стника, соломы, кукурузы, древесины, семян масличных культур и их смесей.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором содержание сухого вещества биомассы составляет от 5 до 30 мас. %.



Фиг. 1



Фиг. 2

заполнение	V: номер сосуда
реакция	N: число повторов цикла
опорожнение	
с/р	

