

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035111**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.28

(21) Номер заявки
201692347

(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**

(43) **2017.04.28**

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

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

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КЛАРИАНТ ИНТЕРНЭШНЛ ЛТД
(CH)

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

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

(56) JU, L.-K. & AFOLABI, O.A.: "Wastepaper Hydrolysate as Soluble Inducing Substrate for Cellulase Production in Continuous Culture of *Trichoderma reesei*", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 15, 1999, pages 91-97, XP008148771, abstract, page 91, column 2, line 25 - page 93, column 1, line 10; figure 1; table 1, page 93, column 1, line 27 - page 97, column 1, line 24; figures 2-6; tables 2, 3

WYMAN, C.E. ET AL.: "43 Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose", 2005, XP055125961, Retrieved from the Internet: URL: http://nsm1.nsm.iup.edu/jford/projects/misc/HydrolysisOfCelluloseAndHemicellulose_review.pdf [retrieved on 2014-06-30] page 6, column 2, line 14 - page 7, column 1, line 13; figure 4

PALMQVIST, E. ET AL.: "Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment", ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 20, 1997, pages 286-293, XP007904791, abstract page 286, column 2, line 10 - page 288, column 2, line 12; figures 1, 2 page 289, column 2, line 15 - page 292, column 1, line 27; figures 3, 5; table 1

JOURDIER, E. ET AL.: "Comprehensive Study and Modeling of Acetic Acid Effect on *Trichoderma reesei* Growth", INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, vol. 9, no. 3, June 2013 (2013-06), pages 132-138, XP002741383, abstract, page 132, column 2, line 2 - page 133, column 1, line 19, page 137, column 1, line 22 - column 2, line 3

(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.

B1**035111****035111****B1**

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.

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% мас./мас. при расчете на сухое вещество), гемицеллюлозу (~15-25% мас./мас.) при расчете на сухое вещество) и лигнин (~15-30% мас./мас. 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% мас./мас.. Уровень содержания твердого вещества, больший чем 15% мас./мас., 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 целлюбиозе и глюкозе, высвобожденных во время ферментативного гидролиза, может приводить к собственному ингибированию активностей целлюлазы и бета-глюкозидазы (Xiao et al., 2004).

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 суспензий 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 2471940 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 самодостаточного ферментативного гидролиза лигноцеллюлозосодержащего материала, включающего стадии:

- (a) проведение для лигноцеллюлозосодержащего материала предварительной обработки в устройстве предварительной обработки;
- (b) введение подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала стадии a) в контакт по меньшей мере с одним ферментом, относящимся к классу гидролаз, в емкости гидролиза для получения гидролизата;
- (c) выделение гидролизата и последующее разделение гидролизата на две части (i) и (ii), где часть (i) направляют в емкость культивирования;
- (d) ферментирование 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;
- (e) повторное направление 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 самодостаточным, 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, солову 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 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 40 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 70 мас.%, еще более предпочтительно по меньшей мере 80 мас.%, а наиболее предпочтительно по меньшей мере 90 мас.% 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 по меньшей мере к 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, pH-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% мас./мас., предпочтительно от 0,05 до 12,5% мас./мас., более предпочтительно от 0,1 до 10% мас./мас., 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. Время реакции во время парового взрыва должно быть выбрано в диапазоне от 10 с до 2 ч, предпочтительно от 1 мин до 1,5 ч, а наиболее предпочтительно от 5 мин до 1 ч 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 pH в диапазоне от 1 до 5, предпочтительно при значении pH 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% (мас.) (мас./мас.), предпочтительно от 0,05 до 12,5% (мас.) (мас./мас.), более предпочтительно от 0,1 до 10% (мас.) (мас./мас.), а наиболее предпочтительно от 0,25 до 7,5% (мас.). 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 мин, предпочтительно от 2 до 30 мин, а наиболее предпочтительно от 5 до 15 мин. 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*), бело-красная 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% мас./мас., предпочтительно находится в диапазоне от 25 до 65% мас./мас., а в особенности предпочтительно от 40 до 55% мас./мас..

В рамках способа настоящего изобретения после этого подвергнутый предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащий материал вводят в контакт по меньшей мере с 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% мас./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% мас./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% мас./мас. от исходного сырья, предпочтительно от 0,1 до 5% мас./мас. от исходного сырья, дополнительно предпочтительно от 0,15 до 4% мас./мас. от исходного сырья, а в особенности предпочтительно от 0,2 до 3,5% мас./мас. 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 ч. 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% мас./мас. 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 ч. Как это ни удивительно, но даже при режимах с малой дозировкой фермента могли быть получены выходы гидролиза, большие чем 70% мас./мас. по отношению к совокупным сахарам, содержащимся в упомянутом исход-

ном 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 целлюбогидролазы (CBH) I, II, эндоглюканазы (EG) I-IV, бета-глюкозидазы (BGL)), экзо- и эндогемичеселлюлаз (то есть ксиланазы, ксилозидазы, ксилобиазы, арабиназы, арабинофукозидазы, маннаназы, 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 целлюбогидролазы типа I или типа II (CBH I или CBH II), эндоглюканазы типа I, II, III или IV (EGI, EGII, EGIII, EGIV), бета-глюкозидазы (BGL), эстеразы, экзогемичеселлюлазы и эндогемичеселлюлазы. Еще более предпочтается, чтобы экзогемичеселлюлазу и эндогемичеселлюлазу предпочтительно выбирали бы из ксиланазы, ксилозидазы, ксилобиазы, арабиназы, арабинофукозидазы, маннаназы, маннозидазы, галактазы и галактозидазы.

В соответствии со стадией (c) 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 (c) 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% мас./мас., предпочтительно 30% мас./мас., в особенности предпочтительно 40% мас./мас., а наиболее предпочтительно 50% мас./мас. твердого содержимого. Еще один способ выделения, соответствующий стадии (c), представляет собой центрифугирование в результате, например, использования декантатора.

В соответствии со стадией (c) 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% мас./мас. (по отношению к совокупной массе материала культивирования), предпочтительно от 5 до 30% мас./мас. (по отношению к совокупной массе материала культивирования), а наиболее предпочтительно от 10 до 20% мас./мас. (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., *Burkholderia* 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 одну плесень, способную 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., *Penicillium* 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 добываются 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 ч до 14 дней, предпочтительно от 10 ч до 7 дней, дополнительно предпочтительно от 24 ч 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 значениях pH 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% мас./об., дополнительно предпочтительно меньшей чем 8% мас./об., а в особенности предпочтительно меньшей чем 5% мас./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/ч. 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 ч, например, постоянную загрузку в течение 60 ч, что после этого прекращают вплоть до окончания времени ферментирования в 100 ч. Еще один возможный пример заключается в начальном проведении операции при постоянной загрузке в течение 20 ч, что прерывают по истечении 20 ч и возобновляют, как только ферментируемый сахар в гидролизате будет полностью подвергнут ферментированию.

После ферментирования подвергнутый ферментированию гидролизат повторно направляют в емкость гидролиза, соответствующую стадии (e) способа настоящего изобретения. Повторное направление, соответствующее стадии (e) 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 (e) 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 (a) 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 (a) до (c) 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 мо-

жет 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, галактоглокоманнан, арабиногалактан, арабиноглокуроноксиан, 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, сиригильовый спирт, сиригильдегид, сиреневую кислоту, триметилгалловую кислоту, гомокатехин, этилванилин, креозол, п-метиланизол, анисовый альдегид, анисовую кислоту, фурфураль, гидроксиметилфурфураль, 5-гидроксиметилфурфураль, муравьиную кислоту, уксусную кислоту, левоулиновую кислоту, коричную кислоту, кониферильовый 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 осуществления 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 предпочтается, 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 абс., более предпочтительно при менее чем 500 мбар абс., еще более предпочтительно при менее чем 250 мбар абс., а наиболее предпочтительно при менее чем 125 мбар абс. Предпочтительные диапазоны заключены в пределах от 75 до 750 мбар абс. и от 75 до 250 мбар абс. 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 с до 10 ч, предпочтительно от 1 с до 1 ч, более предпочтительно от 10 с до 30 мин, наиболее предпочтительно от 30 с 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 распадающейся 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 c), 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% мас./об. лигноцеллюлозосодержащего материала, предпочтительно от 0,1 до 25% мас./об., дополнительно предпочтительно от 0,5 до 22% мас./об., а в особенности предпочтительно от 1 до 20% мас./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 по меньшей мере с 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, аминоглюканов, органических растворителей, биотоплив, биологических поверхностно-активных веществ, аминоглюканов, 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 по меньшей мере с 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 lipolytica*, *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*

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 tannophilus* 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, амина-

кислоты, 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, виргиниамидин, 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, цефалоспорины), 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, аминоглюканов, 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 фильтрации 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) проведение для лигноцеллюлозосодержащего материала предварительной обработки в устройстве предварительной обработки;

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

(c) выделение гидролизата и последующее разделение гидролизата на две части, (i) и (ii), где часть (i) направляют в емкость культивирования;

(d) ферментирование 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;

(e) повторное направление 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) проведение для лигноцеллюлозосодержащего материала предварительной обработки в устройстве предварительной обработки;

(b) введение подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала стадии a) в контакт по меньшей мере с одним ферментом, относящимся к классу гидролаз, в емкости

гидролиза для получения гидролизата;

(с) выделение гидролизата и последующее разделение гидролизата на две части (i) и (ii), где часть (i) направляют в емкость культивирования;

(d) ферментирование 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;

(е) повторное направление 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) проведение для лигноцеллюлозосодержащего материала предварительной обработки в устройстве предварительной обработки;

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

(с) выделение гидролизата и последующее разделение гидролизата на две части (i) и (ii), где часть (i) направляют в емкость культивирования;

(d) ферментирование 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;

(е) повторное направление 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% мас./об. лигноцеллюлозосодержащего материала, предпочтительно от 0,15 до 25% мас./об., дополнительно предпочтительно от 0,51 до 22% мас./об., а в особенности предпочтительно от 15 до 20% мас./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 эндогемичеселлюлаз 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 по меньшей мере с 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, аминокислот, органических растворителей, биотоплив, биологических поверхностно-активных веществ, аминокислот, органических соединений.

производных сахаров и их смесей.

Примеры и чертежи

Настоящее изобретение, кроме того, описывается при использовании следующих далее примеров и чертежей. Примеры и чертежи представлены только в целях иллюстрации и не должны пониматься в качестве ограничения изобретения.

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

Фиг. 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% мас./мас. 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 ч и непрерывно проводят в течение еще 85 ч. 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 ч при перемешивании при 50 об/мин. После гидролиза к содержимому емкости гидролиза добавляют 1% мас./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 ч 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 трехкратного выпаривания.

Ферментирование проводят в системе перемешиваемого корпусного биореактора с устройством регулирования температуры, значения pH и уровня растворенного кислорода (=емкость культивирования). Культивирование начинали при 5% мас./мас. культуры для посева. Кроме того, среда содержала соли и минеральные вещества и концентрированный гидролизат в качестве основного источника углерода. Ферментирование проводили при pH 5, 30°C и уровне растворенного кислорода 25%. Загрузку части (i) гидролизата начинали по истечении 15 ч и непрерывно проводили в течение еще 85 ч. 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, pH 5, в течение 96 ч 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 детоксифицированный и концентрированный гидролизат согласно приведенному выше описанию изобретения.

Для выпаривания значение pH 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 и на фиг. 2 продемонстрированы соответствующие выходы глюкозы, ксилозы и NaD1 и количества муравьиной и уксусной кислоты. Данное детоксифицирование в результате приводило к уменьшению количества уксусной кислоты более чем на 80% и муравьиной кислоты ориентировочно на 30%. Результаты продемонстрированы в таблице и на фиг. 2.

**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 ферментативного гидролиза лигноцеллюлозосодержащего материала, включающий стадии:

(а) проведение предварительной обработки лигноцеллюлозосодержащего материала, которую выбирают из механического измельчения, обработки кислотами и/или щелочами, влажного окисления, pH-регулируемого гидротермолита и/или парового взрыва, в устройстве предварительной обработки;

(b) введение подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозосодержащего материала стадии а) в контакт по меньшей мере с одной гидролазой, представляющей собой экзо- и эндоцеллюлазу, выбранную из целлюбогидролазы (CBH) типа I или типа II, эндоглюканазы (EG) типа I-IV, бета-глюкозидазы (BGL); экзо- и эндогемиллюлазу, выбранную из ксиланазы, ксилозидазы, ксилобиазы, арабиазы, арабинофукозидазы, маннаназы, маннозидазы, галактазы и галактозидазы; и эстеразу в емкости гидролиза для получения гидролизата;

(с) выделение гидролизата и последующее разделение гидролизата на две части (i) и (ii), где часть (i) направляют в емкость культивирования;

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

(е) повторное направление подвергнутого ферментированию гидролизата стадии d) в емкость гидролиза стадии b),

где 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 плесневого гриба.

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 плесневого гриба и способного обеспечивать получение по меньшей мере одного фермента, относящегося к классу гидролаз.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, где вещество ингибирует по меньшей мере одного представителя, выбираемого из плесневого гриба и/или микроорганизма и выбираемого из группы, состоящей из видов *Trichoderma* sp. (анаморф: *Hyphocrea* sp.), *Saccharomyces* sp., *Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp., *Pichia* sp. и *Talaromyces* sp.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, 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 предшествующих пунктов, 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.1-4, где вещество удаляют из части (i) и/или (ii) гидролизата, соответствующего стадии (с), в результате выпаривания.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, где в емкость культивирования добавляют дополнительное количество в диапазоне от 0,1 до 30% мас./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 пунктов, где соотношение между частью (i) гидролизата и частью (ii) находится в диапазоне от 0,01 до 1.

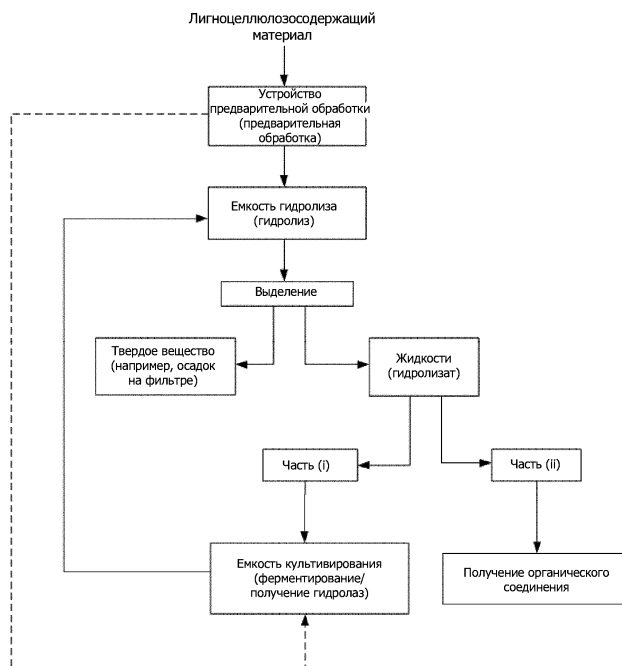
11. Способ по любому из предшествующих пунктов, где концентрация растворимых сахаров во время ферментирования, соответствующего стадии d), является меньшей чем 10% мас./об.

12. Способ получения органического соединения, выбираемого из группы, состоящей из органиче-

ских кислот, аминокислот, капролактамов, антибиотиков, витаминов, ферментов, нуклеотидов/нуклеозидов, биогаза, белков, полисахаридов, аминоклюканов, органических растворителей, биотоплив, биологических поверхностно-активных веществ, производных сахаров и их смесей, включающий стадии по любому из пп.1-11 и дополнительно включающий стадии:

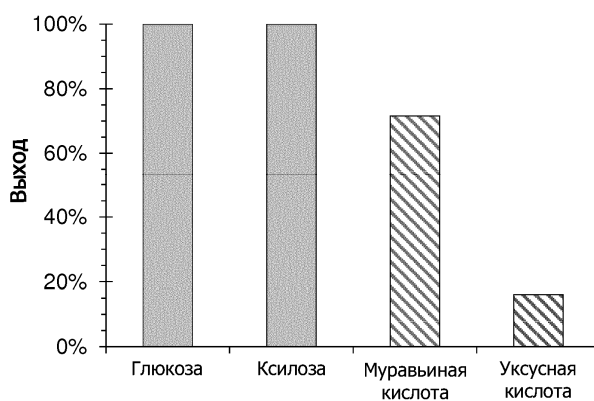
(f1) контактирование части (ii) гидролизата по меньшей мере с одним представителем, выбираемым из микроорганизма и/или плесневого гриба и способным обеспечивать получение указанного органического соединения, или

(f2) химическое превращение, каталитическое превращение, хроматографическое разделение, мембранное разделение и/или кристаллизация части (ii) гидролизата.



Фиг. 1

Выход после термического концентрирования
(коэффициент концентрирования 6,4)



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2