

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036683**

(13) **B1**

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

- |                                       |               |                             |
|---------------------------------------|---------------|-----------------------------|
| (45) Дата публикации и выдачи патента | (51) Int. Cl. | <i>C12P 19/14</i> (2006.01) |
| <b>2020.12.08</b>                     |               | <i>C12N 9/42</i> (2006.01)  |
| (21) Номер заявки                     |               | <i>C12P 19/00</i> (2006.01) |
| <b>201700487</b>                      |               | <i>C12P 19/02</i> (2006.01) |
| (22) Дата подачи заявки               |               | <i>C13K 1/00</i> (2006.01)  |
| <b>2016.04.08</b>                     |               | <i>C13K 11/00</i> (2006.01) |
|                                       |               | <i>D21C 1/10</i> (2006.01)  |
|                                       |               | <i>C08B 15/08</i> (2006.01) |

---

(54) **СПОСОБЫ И СОСТАВЫ ДЛЯ ОБРАБОТКИ ЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ БИОМАССЫ И ПРОДУКТЫ НА ЕЕ ОСНОВЕ**

---

- |                                                                                 |                    |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| (31) 62/145,785; 62/246,271                                                     | (56) WO-A1-9520065 |
| (32) 2015.04.10; 2015.10.26                                                     | WO-A1-2011046816   |
| (33) US                                                                         | WO-A2-2010071805   |
| (43) 2018.06.29                                                                 | US-A-4025389       |
| (86) PCT/CA2016/050402                                                          |                    |
| (87) WO 2016/161515 2016.10.13                                                  |                    |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br><b>КОМЕТ БИОРЕФАЙНИНГ ИНК.</b><br>(CA) |                    |
| (72) Изобретатель:<br><b>Ричард Эндрю, Д'Агостино Дэннис</b><br>(CA)            |                    |
| (74) Представитель:<br><b>Ермакова Е.А. (RU)</b>                                |                    |

- 
- (57) В изобретении описан двухэтапный способ активации целлюлозного сырья. Сырье подвергается первому этапу высокотемпературной активации при температуре более 190°C и второму этапу активации при более низкой температуре в щелочной среде. Здесь также описаны способы и композиции ферментативного гидролиза активированной целлюлозы с применением одного или нескольких целлюлолитических ферментов, сурфактанта и полиаспаргиновой кислоты. Также здесь описаны результаты применения настоящих способов.

**B1**

**036683**

**036683**

**B1**

### **Перекрестные ссылки на предшествующие заявки**

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно Парижской конвенции по заявке на патент США № 62/145785, поданной 10 апреля 2015 г., и заявке на патент США № 62/246271, поданной 26 октября 2015 г., содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

### **Область техники изобретения**

Настоящая заявка относится к способам обработки целлюлозной биомассы для получения целлюлозных сахаров. В одном аспекте рассмотрены способы активации целлюлозного сырья и/или ферментативного гидролиза для получения глюкозы. Также описано активированное целлюлозное сырье и продукты, полученные путем ферментативного гидролиза активированного целлюлозного сырья.

### **Введение**

Получение сахаров, таких как глюкоза, из целлюлозной биомассы является предметом обширных исследований и разработок. Однако высокая стоимость и низкий коэффициент конверсии многих процессов ограничивает широкое применение технологии целлюлозного сахара.

Из уровня техники известно несколько разных способов преобразования целлюлозной биомассы в сахара. Они обычно включают этап предварительной обработки, на котором целлюлозная биомасса физически и/или химически изменяется для раскрытия структуры полимерных сахаров, содержащихся в целлюлозной биомассе, а также этап ферментативного или химического гидролиза, на котором полимерные сахара расщепляются на мономерные сахара.

Хотя наблюдается высокий выход глюкозы (>90%) на основе целлюлозы, такой выход обычно достигается при низких концентрациях глюкозы, как правило, 2-5%. Способы, позволяющие достичь высокого выхода и высокой концентрации глюкозы, сложны в реализации, так как присутствие глюкозы обычно снижает активность целлюлолитических ферментов даже при высоких нагрузках ферментов. Активность целлюлолитических ферментов снижается со временем, что влечет за собой необходимость добавления свежего фермента в реакции ферментативного гидролиза для поддержания выхода. Тем не менее, высокая стоимость целлюлолитических ферментов может стать препятствующим фактором. Целлюлолитические ферменты также могут связываться со стойкой целлюлозой и/или лигнином и становиться непригодными для дальнейшего гидролиза целлюлозы до глюкозы. Такое непродуктивное связывание также препятствует рециркуляции ферментов, что необходимо для снижения использования ферментов и более низких текущих затрат.

Для предварительной обработки целлюлозного сырья разработаны различные процессы, в частности, для преобразования обработанного целлюлозного сырья в сахара разработаны процессы ферментативного гидролиза. Например, Parekh (публикация WO 2014/026154) описывает двухступенчатый процесс предварительной обработки лигноцеллюлозной биомассы преимущественно в кислой среде. Schiffino и соавт. (публикация США № 2011/0250645) описывают способы улучшения высвобождения мономерных сахаров из обработанной щелочью биомассы. Liu и соавт. (публикация США № 2011/0300586) описывают двухступенчатый процесс предварительной обработки лигноцеллюлозной биомассы в целях сокращения кристалличности целлюлозы и разделения гемичеселлюлозно-целлюлозного комплекса. Варианты осуществления включают паровую обработку низкой степени жесткости или автогидролиз с последующим гидролизом с помощью разбавленной кислоты или горячей воды.

### **Сущность изобретения**

Настоящее раскрытие дает читателю более подробное описание, представленное ниже, а также не ограничивает и не определяет какое-либо заявленное или еще не заявленное изобретение. Одно или несколько изобретений могут быть представлены в любой комбинации или подкомбинации элементов или этапов процесса, раскрытых в любой части настоящего документа, включая формулу изобретения и рисунки.

Согласно одному широкому аспекту в настоящем изобретении предложен способ активации целлюлозного сырья для увеличения химической и/или ферментативной реактивности целлюлозы в сырье. Активированная целлюлоза может впоследствии преобразовываться в целлюлозные сахара, например, подвергая активированную целлюлозу ферментативному гидролизу.

В соответствии с данным аспектом, целлюлозное сырье может проходить первый этап высокотемпературной активации, за которым следует второй этап активации при более низкой температуре в щелочной среде. Согласно настоящему варианту осуществления изобретения данный способ может включать прохождение первого этапа активации сырья, на котором сырье обрабатывается при температуре более 190°C и давлении более 200 фунтов/кв.дюйм изб. для получения первого потока активированной целлюлозы, включающего целлюлозу II и нерастворимые твердые вещества. Нерастворимые твердые вещества могут включать компоненты сырья, кроме целлюлозы, такие как лигнин. Далее первый поток активированной целлюлозы может проходить второй этап активации, на котором первый поток активированной целлюлозы обрабатывается щелочью при более низкой температуре, чем на первом этапе активации, для получения второго потока активированной целлюлозы, включающего целлюлозу IV. Первый этап активации предпочтительно выполняется в присутствии воды.

Не ограничиваясь теорией, предполагается, что первый этап активации изменяет кристаллическое состояние целлюлозы в целлюлозном сырье для получения первого потока активированной целлюлозы с

большой долей целлюлозы II по отношению к количеству целлюлозы II в целлюлозном сырье. Считается, что второй этап активации также изменяет кристаллическое состояние целлюлозы в первом потоке активированной целлюлозы для получения второго потока активированной целлюлозы с большей долей целлюлозы IV по отношению к количеству целлюлозы IV в первом потоке активированной целлюлозы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения двухэтапный способ активации, описанный в данном документе, позволяет получать смесь целлюлозы II, гидратцеллюлозы II и щелочной целлюлозы IV. При необходимости, целлюлозный материал может обрабатываться, например, промываться и/или фильтроваться после одного или каждого этапа активации для удаления растворимых нецеллюлозных компонентов.

Также определено, что способ активации целлюлозы, описанный в настоящем документе, дает возможность получать активированную целлюлозу с повышенным уровнем глюкозы и/или пониженным уровнем нецеллюлозных компонентов целлюлозного сырья, таких как лигнин. К примеру, в одном варианте осуществления описанные способы позволяют получать активированную целлюлозу как минимум с 60, 70 или 75% глюкозы. В другом варианте осуществления описанные способы дают возможность получать активированную целлюлозу менее чем с 25, 20 или 15% лигнина.

Согласно другому широкому аспекту способы и составы предназначены для стабилизации ферментов во время ферментативного гидролиза, поддержания ферментативной активности и/или получения потока рециркуляции ферментов.

В соответствии с еще одним широким аспектом предусмотрена смесь для ферментативного гидролиза, пригодная для использования в ферментативном гидролизе целлюлозы. В предпочтительном варианте осуществления изобретения смесь для ферментативного гидролиза контактирует с активированной целлюлозой, полученной описанными способами.

В соответствии с вышеуказанными аспектами предусматривается один или несколько целлюлолитических ферментов в сочетании с сурфактантом и/или диспергентом для ферментативного гидролиза целлюлозы. Не ограничиваясь теорией, считается, что целлюлолитические ферменты образуют комплекс с сурфактантом и/или диспергентом, который может стабилизировать ферменты, поддерживать их активность, предотвращать ухудшение их свойств и/или способствовать их восстановлению после ферментативного гидролиза. Также предполагается, что присутствие диспергента, такого как олигопептид, дает возможность предотвратить непродуктивное связывание целлюлолитических ферментов путем взаимодействия с лигнином и/или другими нецеллюлозными компонентами. В предпочтительном варианте осуществления изобретения сурфактант представляет собой неионное поверхностно-активное вещество, такое как полисорбатное поверхностно-активное вещество. В другом предпочтительном варианте осуществления сурфактант представляет собой смесь сурфактантов, таких как Tween™, алкоксилированный глицерид и нонил фенол. В еще одном варианте осуществления изобретения диспергент представляет собой неферментный олигопептид, как вариант, полиаминокислоту, например полиаминокислоту с молекулярной массой от 500 до 10000, от 1000 до 5000 или от 3500 до 4500. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения полиаминокислота представляет собой полиаспаргиновую кислоту.

В описанных способах и составах предложен ряд преимуществ в плане активации целлюлозы и/или приготовления целлюлозных сахаров, которые могут быть получены на основе некоторых указанных вариантов осуществления изобретения. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения использование описанных способов и составов может привести к образованию потока богатого глюкозой сахара с примерно более 12, 14, 16 или 18% глюкозы. Кроме того, в указанных или других вариантах осуществления описанные способы и составы могут обеспечить высокий выход мономерных сахаров. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения описанные способы и составы могут обеспечивать выход глюкозы примерно выше 70, 85, 90 или 95% теоретического выхода глюкозы. Теоретический выход глюкозы в реакции ферментативного гидролиза может определяться на основании содержания глюкозы в активированном целлюлозном материале, подвергающемся ферментативному гидролизу. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления описанные способы и составы могут привести к образованию потока богатого глюкозой сахара с высоким выходом и высокой концентрацией глюкозы. К примеру, в одном варианте осуществления изобретения поток богатого глюкозой сахара имеет примерно более 12% глюкозы и выход выше 70%, либо более 14% глюкозы и выход выше 80%, либо более 16% глюкозы и выход выше 90%.

В соответствии с еще одним широким аспектом предусмотрены способы ферментативного гидролиза активированной целлюлозы для получения целлюлозных сахаров, таких как глюкоза. Согласно настоящему варианту осуществления ферментативный гидролиз может осуществляться как периодический или непрерывный процесс. Ферментативный гидролиз может выполняться с помощью смеси для ферментативного гидролиза и/или активированной целлюлозы, как раскрыто в настоящем документе.

В соответствии с другим аспектом предусмотрены способы обработки потока богатого глюкозой сахара для удаления ферментов, используемых для ферментативного гидролиза. Удаление и/или рециркуляция ферментов, используемых для ферментативного гидролиза, может сократить количество ферментов, необходимых для ферментативного гидролиза, и, таким образом, затраты, связанные с производством целлюлозных сахаров. Например, описанные способы и составы могут применяться для восста-

новления как минимум 60, 70, 80 или 85% активности целлюлолитических ферментов в потоке рециркуляции ферментов после ферментативного гидролиза. Поток рециркуляции ферментов может рециркулировать для продолжения обработки активированной целлюлозы и/или применяться для обработки свежей активированной целлюлозы, например, второго потока активированной целлюлозы, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления поток богатого глюкозой сахара подвергается нескольким обработкам с удалением ферментов, будь то одинаковой обработке, повторяющейся многократно, или разным обработкам с удалением ферментов.

Согласно другому аспекту предусматривается поток богатого глюкозой сахара, полученный описанным способом. В одном варианте осуществления изобретения поток сахара включает более 12, 14, 16 или 18% глюкозы. В еще одном варианте осуществления поток сахара включает полиаспаргиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления полиаспаргиновая кислота присутствует в концентрации от 1 до 10 000 мкг/г.

В соответствии с еще одним аспектом предусмотрен способ получения потока богатого глюкозой сахара, включающий (а) получение активированной целлюлозы, включающей смесь целлюлозы II, гидратцеллюлозы II и щелочной целлюлозы IV; и подвержение активированной целлюлозы ферментативному гидролизу с одним или несколькими целлюлолитическими ферментами, сурфактантом и диспергентом для получения потока богатого глюкозой сахара. При необходимости, активированную целлюлозу получают описанным здесь способом.

Согласно другому аспекту предусмотрен поток богатого глюкозой сахара, дополнительно включающий неглюкозный сахар, причем неглюкозный сахар представлен одним или несколькими компонентами из числа ксилозы, ксилоолигосахарида и ксилана. В еще одном варианте осуществления изобретения неглюкозные сахара включают примерно 3-8, 4-7 или 5-6% сухого вещества в составе. В конкретном варианте осуществления поток богатого глюкозой сахара включает примерно 5% неглюкозного сахара.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предусмотрен поток богатого фруктозой сахара, полученный путем преобразования глюкозы в потоке богатого глюкозой сахара по настоящему изобретению во фруктозу. Поток богатого фруктозой сахара дополнительно включает нефруктозный сахар, причем нефруктозный сахар представлен одним или несколькими компонентами из числа ксилозы, ксилоолигосахарида и ксилана. В одном варианте осуществления нефруктозные сахара включают примерно 1-8, 2-7 или 3-6% сухого вещества в составе. В конкретном варианте осуществления поток богатого фруктозой сахара включает примерно 5% неглюкозного сахара.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предусмотрен глюкозный или фруктозный сироп с более низким гликемическим индексом, причем глюкозный или фруктозный сироп включает примерно 1-8, 2-7 или 3-6% одного или нескольких компонентов из числа ксилозы, ксилоолигосахарида и ксилана, при этом данный гликемический индекс ниже гликемического индекса стандартного глюкозного или фруктозного сиропа, полученного обычным образом.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут более очевидными из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, указывающие на варианты осуществления настоящего изобретения, представлены только для наглядности, поскольку различные изменения и модификации в существе и объеме настоящего изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники исходя из данного подробного описания. В частности, необходимо иметь в виду, что в способе могут использоваться все раскрытые здесь аспекты или любая конкретная комбинация либо подкомбинация аспектов.

#### **Чертежи**

Чертежи, включенные в настоящий документ, представлены для демонстрации различных примеров способов и составов по настоящему изобретению и не ограничивают его объем.

Настоящее изобретение описано далее со ссылкой на чертеж, на котором представлена блок-схема способа по предпочтительному варианту осуществления изобретения, который включает двухэтапную активацию целлюлозного сырья, ферментативный гидролиз активированного сырья и обработку с удалением ферментов для получения потока рециркуляции ферментов, а также потока богатого глюкозой и неферментного сахара.

#### **Описание различных вариантов осуществления изобретения**

Различные способы и составы описаны ниже в качестве примера осуществления каждого заявленного изобретения. Ни один представленный ниже вариант осуществления не ограничивает какое-либо заявленное изобретение, и оно может включать способы и составы, отличающиеся от нижеописанных. Заявленные изобретения не ограничены способами и составами, имеющими все признаки любого нижеописанного способа и состава, либо признаками, общими для нескольких или всех нижеописанных способов и составов. Способ или состав, описанный ниже, может не являться вариантом осуществления любого заявленного изобретения. Любое изобретение, раскрытое в нижеописанном способе или составе, которое не заявлено в настоящем документе, может быть объектом другого средства правовой защиты, например, продолжающей заявки на патент, а заявители, изобретатели или владельцы не намерены отказываться, отклонять или делать всеобщим достоянием такое изобретение путем его раскрытия в настоящем документе.

В настоящем документе описаны различные способы и составы, необходимые для обработки целлюлозной биомассы в целях получения целлюлозных сахаров. В одном варианте осуществления изобретения предусмотрен способ активации целлюлозного сырья для получения активированной целлюлозы. Было определено, что прохождение первого этапа активации целлюлозного сырья при высокой температуре и давлении, за которым следует второй этап активации с помощью щелочи при более низкой температуре, чем на первом этапе активации, дает возможность получать активированную целлюлозу с химическими и/или физическими свойствами, предпочтительными для гидролиза целлюлозы до мономерных сахаров.

В способах, раскрытых в настоящем документе, применяется целлюлозное сырье 10. Целлюлозное сырье 10 может быть любым сырьем, известным из уровня техники целлюлозного сахара. Например, целлюлозное сырье может включать один или несколько компонентов из числа пшеничной соломы, кукурузной соломы, жома, древесины твердых пород, древесины мягких пород, энергетических культур и т.д.

Сырьевой сельскохозяйственный материал, поставляемый на завод, может обрабатываться для удаления камней, грунта и другого материала, присутствующего в сырьевом сельскохозяйственном материале, а также сокращения размера сырьевого сельскохозяйственного или лесохозяйственного материала, который используется в процессе, например, путем дробления, измельчения, перемалывания или иной обработки.

На примере фиг. 1 целлюлозное сырье 10 может подаваться в реактор 14, в котором оно проходит первый этап активации для получения первого потока активированной целлюлозы 16. На первом этапе активации целлюлозное сырье 10 может обрабатываться при повышенной температуре и давлении для получения первого потока активированной целлюлозы 16, включающего целлюлозу II и нерастворимые твердые вещества.

В качестве реактора 14 может использоваться реактор периодического действия и реактор продолжительного действия. В случае реактора периодического действия целлюлозное сырье 10 может подаваться в реактор 14, а реактор, представленный реактором смешения, может быть доведен до рабочих условий в течение необходимого времени. Если реактор 14 представлен реактором продолжительного действия, то это может быть паровой реактор, известный из уровня техники, который можно поддерживать в необходимом рабочем режиме.

Первый этап активации может проводиться в условиях, которые способствуют увеличению количества целлюлозы II в первом потоке активированной целлюлозы по отношению к количеству целлюлозы II в сырье.

Температура может составлять более 190°C и при необходимости более 210°C, предпочтительно более 220°C, и может быть приблизительно менее 250°C. Соответственно данный процесс может проводиться в диапазонах температуры 190-250°C, 210-250°C, 220-240°C или 222-230°C.

Давление может составлять более 200 фунтов/кв.дюйм изб. и при необходимости менее 50 фунтов/кв.дюйм изб. Давление в реакторе соответствует температуре как минимум исходя из термодинамики насыщенного пара. В одном из вариантов осуществления изобретения давление можно увеличить, чтобы оно превышало указанное значение, добавив сжатый газ или перегретый пар.

Целлюлозное сырье 10 может подвергаться обработке на первом этапе активации менее 30, менее 20, менее 10 или менее 5 мин. Длительность времени обработки будет меняться в зависимости от многих факторов, включая степень жесткости этапа активации, т.е. температура и давление в реакторе 14.

Следует принять во внимание, что температуры, давления и длительность обработки могут объединяться в любом необходимом сочетании. Соответственно, например, первый этап активации может включать подвержение сырья воздействию давления от 200 до 500 фунтов/кв. дюйм изб. и температуры от 200 до 250°C на протяжении от 1 до 30 мин, или давления от 200 до 500 фунтов/кв.дюйм изб. и температуры от 190 до 215°C на протяжении не менее 4 мин.

Дополнительно, первый этап активации проводится в присутствии воды. Вода может быть введена в реактор 14 посредством одного или нескольких присутствующих в целлюлозном сырье 10, присутствующих в реакторе 14 при введении целлюлозного сырья в реактор 14, а также посредством введения сырьевого потока 12. Общее содержание влаги в реакторе может быть как минимум от 30 до 90%. В конкретном варианте осуществления изобретения содержание влажности в реакторе равно 50%.

Вода, находящаяся в реакторе 14, может иметь форму пара или жидкости, которая является предпочтительной. Следует принять во внимание, что температура и давление первого этапа активации могут быть подобраны таким образом, что в реакторе 14 будет находиться жидкая вода.

Содержание твердых веществ в первом потоке активированной целлюлозы 16 может составлять примерно от 30 до 50% твердых частичек по массе. Твердые вещества будут включать главным образом целлюлозу, которая может последовательно подвергаться второму этапу активации. В дальнейшем твердые вещества могут включать лигнин, гемицеллюлозу и второстепенные компоненты, такие как зола, белок или экстрактивные вещества.

При необходимости, целлюлозный материал может подвергаться одному или нескольким этапам промывания, а также одинаковым или различным условиям после первого/второго этапа активации. По-

этому первый поток активированной целлюлозы 16 может подвергаться одному или нескольким этапам промывания перед вторым этапом активации для удаления растворимых нецеллюлозных компонентов, таких как гемицеллюлоза, зола, экстрактивные вещества и лигнин. Первое промывание удаляет данные растворимые вещества и, так как растворимые вещества имеют рН кислоты, этап промывания также снижает уровень необходимого количества щелочи на втором этапе активации щелочи.

Как показано на фиг. 1 первый поток активированной целлюлозы 16 и вода для промывания 20 могут вводиться в реактор 18 для получения сточной воды 22 и очищенного первого потока активированной целлюлозы 24.

Вода для промывания 20 может быть горячей, имея температуру примерно от 40 до 100°C, или примерно от 50 до 95°C. Поток сточной воды 22 может обрабатываться и рециркулироваться во время определенного процесса, в каких-либо других условиях, или слита.

Реактор промывания 18 может иметь любую конструкцию, известную из уровня техники. При необходимости, реактор промывания 18 может эксплуатироваться встречно при помощи, например, противоточного фильтра. Возможно использование других методов фильтрации и разделения, например фильтр-пресс, двухвалковый пресс, ротационный вакуум-фильтр или центрифуга.

Как показано на фиг. 1, очищенный первый поток активированной целлюлозы 24 может быть направлен в реактор 26, где очищенный первый поток активированной целлюлозы 24 подвергается второму этапу активации для получения второго потока активированной целлюлозы 30. В альтернативном варианте осуществления изобретения некоторые или все первые потоки активированной целлюлозы могут быть введены в реактор 26. Следующее описание основано на фиг. 1, в котором приведен пример использования первого этапа промывания. На втором этапе активации очищенный первый поток активированной целлюлозы 24 обрабатывается щелочью при более низкой температуре, чем на первом этапе активации, для получения второго потока активированной целлюлозы, включающего целлюлозу IV.

В качестве реактора 26 может использоваться реактор периодического действия и реактор продолжительного действия. При использовании реактора периодического действия, очищенный первый поток активированной целлюлозы 24 может быть направлен в реактор 26, а реактор, который возможно использовать в качестве реактора с механическим перемешиванием, может поддерживаться в определенном рабочем состоянии на протяжении необходимого периода времени. Если реактор 26 представлен реактором продолжительного действия, то это может быть паровой реактор, известный из уровня техники, который можно поддерживать в необходимом рабочем режиме.

Второй этап активации может проводиться при условиях, способствующих росту количества целлюлозы IV во втором потоке активированной целлюлозы по отношению к объему целлюлозы IV в очищенном первом потоке активированной целлюлозы 24.

В некоторых случаях температура превышает 60°C и может быть примерно ниже 180, 160, 140, 120, 100 или 80°C. Соответственно, процесс может проводиться в диапазоне температур 60-180°C, 60-160°C, 60-140°C, 60-120°C, 60-100°C или 60-80°C.

В некоторых случаях второй этап активации проводится при избыточном давлении. Например, избыточным давлением может быть давление примерно от 0,1 до 400 фунтов/кв.дюйм изб.

Очищенный первый поток активированной целлюлозы 24 может подвергаться второму этапу активации на протяжении менее 180, менее 120, менее 90 или менее 60 мин и в некоторых случаях на протяжении более 15, более 30, или более 45 мин. Длительность времени обработки будет меняться в зависимости от многих факторов, включая степень жесткости этапа активации, т.е. температура и давление в реакторе 26.

Следует принять во внимание, что температуры, давления и длительность обработки могут объединяться в любом необходимом сочетании. Соответственно, например, второй этап активации может включать подвержение первого потока активированной целлюлозы температуре от 60 до 240°C на протяжении от 15 до 120 мин и при давлении от 0 до 500 фунтов/кв.дюйм изб., или температуре от 80 до 150°C на протяжении 60 мин и при давлении от 0 до 300 фунтов/кв.дюйм изб.

Как показано на фиг. 1, второй этап активации предпочтительно включает обработку первого потока активированной целлюлозы в присутствии щелочи. Щелочь может быть введена в реактор 26 любым способом. В частности, как показано на примере, где поток щелочи 28 вводится в реактор 26 отдельно. Следует принять во внимание, что поток щелочи 28 может вводиться в реактор 26 перед, а на данный момент вместе или одновременно с вводом очищенного первого потока активированной целлюлозы 24 в реактор 26. Поочередно поток щелочи 28 может быть введен в очищенный первый поток активированной целлюлозы 24, после чего в реактор будет введен комбинированный поток.

Щелочь может включать один или большее количество гидроокиси натрия, гидроокиси калия, гидроокиси магния или аммиака. В одном варианте осуществления изобретения щелочь является гидроокисью натрия. В другом варианте осуществления изобретения щелочь вводится примерно при 1-10%, 2-7% или предпочтительно не менее 6% от общего количества нерастворимых твердых веществ в первом потоке активированной целлюлозы 24. Щелочь увеличивает количество целлюлозы, а также разрывает межмолекулярную и внутримолекулярную водородную связь целлюлозы, таким образом, меняя кристаллическую структуру.

В некоторых случаях второй этап активации может проводиться в присутствии окисляющего средства и/или фермента, такого как лакказа и/или фермент, изменяющий лигнин.

Примеры окисляющих средств, применимых для использования на втором этапе активации, но не ограничивающихся перекисью водорода ( $H_2O_2$ ). В одном варианте осуществления изобретения окисляющее средство вводится при менее 2% и/или примерно выше 0,0001% от общего количества нерастворимых твердых веществ в первом потоке активированной целлюлозы 16/24. В другом варианте осуществления настоящего изобретения окисляющее средство вводится при менее 1%, менее 0,1% или примерно менее 0,001% от общего количества нерастворимых твердых веществ в первом потоке активированной целлюлозы 16/24, в некоторых случаях от 1 до 0,0001%.

Примеры ферментов, применимых для использования на втором этапе активации, но не ограничивающиеся ферментами, изменяющими лигнин, такими как фермент, окисляющий лакказу.

Содержание твердых веществ во втором потоке активированной целлюлозы 30 может быть примерно от 5 до 50% твердых веществ по массе, предпочтительно от 20 до 35% твердых веществ. Твердые вещества будут включать главным образом целлюлозу, которая в некоторых случаях может быть восстановлена и рециркулирована. Другими компонентами будут гемицеллюлоза и лигнин, оба менее 20%.

В некоторых случаях второй поток активированной целлюлозы 30 может быть подвержен одному или нескольким этапам промывания после активации для удаления щелочи и растворенного лигнина.

Второй поток активированной целлюлозы 30 и вода для промывания 34 могут быть введены в реактор промывания 32 для получения сточной воды 36 и очищенного второго потока активированной целлюлозы 38. Реактор промывания 32 может эксплуатироваться аналогично реактору промывания 18 или иным образом.

Вода для промывания 34 может быть горячей, имея температуру примерно от 50 до 95°C, или примерно от 60 до 95°C. Поток сточной воды 36 может обрабатываться и рециркулироваться во время определенного процесса, в каких-либо других условиях, или слита.

Реактор промывания 32 может иметь любую конструкцию, известную из уровня техники. При необходимости, реактор промывания 32 может эксплуатироваться встречно при помощи, например, противоточного фильтра. Возможно использование других методов фильтрации и разделения, например фильтр-пресс, двухвалковый пресс, ротационный вакуум-фильтр или центрифуга.

Преимущество подвержения целлюлозного сырья первому этапу активации при высокой температуре, за чем следует второй этап активации при температурах ниже и в щелочной среде, было продемонстрировано для увеличения уровня глюкозы и снижения уровня лигнина во втором потоке активированной целлюлозы 30 относительно сырья, подверженного только первому этапу высокотемпературной активации. Не ограничиваясь теорией, предполагается, что двухэтапный процесс активации, изложенный здесь, изменяет кристалличность целлюлозы в сырье и улучшает физические и/или химические свойства целлюлозы для ферментативного гидролиза. В одном варианте осуществления изобретения двухэтапный процесс активации отражается в активированной целлюлозе, включающей в себя целлюлозу II и щелочную целлюлозу IV.

Специалисту должно быть понятно, что, в зависимости от расположения водородных связей между и в пределах нитей существует несколько различных кристаллических структур. Например, целлюлоза природного происхождения, добытая из целлюлозной биомассы, является целлюлозой I, имеющей структуры I<sub>α</sub> и I<sub>β</sub>. Целлюлоза в искусственных целлюлозных волокнах, как правило, является целлюлозой II. Искусственные целлюлозные волокна относятся к волокнам, полученным путем вискозного процесса для вискозного производства целлофана или вискозного волокна. Преобразование целлюлозы I в целлюлозу II является необратимым. Структуры целлюлозы III и целлюлозы IV могут быть получены путем различных химических обработок. Различные кристаллические формы целлюлозы могут быть обнаружены при помощи характерной рентгеновской дифракционной картины. Целлюлоза и различные целлюлозные структуры далее описаны в статье "Структура и получение целлюлозы" Переса и Самайна, журнал *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* ("Достижения в химии углеводов и биохимии"), т. 64, Elsevier (2010 г.), которая полностью включена посредством ссылки.

Очищенный второй поток активированной целлюлозы 38 может быть подвержен ферментационному гидролизу в реакторе ферментационного гидролиза 40 с одним или большим количеством целлюлолитических ферментов 42 для получения потока богатого глюкозой сахара 44. Следует принять во внимание, что некоторые или все потоки активированной целлюлозы 30 могут быть подвержены ферментационному гидролизу и соответственно только часть или ни один из вторых потоков активированной целлюлозы 30 могут быть подвержены промыванию. Следующее описание может применяться по отношению ко второму потоку активированной целлюлозы 30, подверженной или не подверженной этапу промывания.

Было определено, что активированная целлюлоза, содержащая целлюлозу II (которая может быть сочетанием целлюлозы II и гидратцеллюлозы II) и целлюлозу IV (которая может быть щелочной целлюлозой IV), которая может быть получена в результате двухэтапного процесса активации, раскрытого здесь, особо подвержена ферментационному гидролизу. В частности, активированная целлюлоза проявила способность к поглощению целлюлолитических ферментов. Содержание активированной целлюлозы

с одним или большим количеством целлюлолитических ферментов в потоке богатого глюкозой сахара, прежде всего, может оказать влияние на ферменты, поглощенные активированной целлюлозой. Затем возможно удаление целлюлозы из потока богатого глюкозой сахара и, при необходимости, введение в реактор ферментационного гидролиза 40.

Таким образом, активированная целлюлоза, полученная любым методом, раскрытым здесь, может быть подвержена ферментационному гидролизу для разделения целлюлозы на целлюлозные сахара, такие как глюкоза. Поочередно процесс ферментационного гидролиза, раскрытый здесь, может быть использован с любым целлюлозным сырьем стандартного целлюлозного гидролиза.

Соответственно активированная целлюлоза, при необходимости второй поток активированной целлюлозы, как описано здесь, могут контактировать с одним или несколькими целлюлолитическими ферментами для получения потока богатого глюкозой сахара. Как показано на фиг. 1, очищенный второй поток активированной целлюлозы 30 и поток ферментов 42 вводятся в реактор ферментационного гидролиза 42 для получения потока богатого глюкозой сахара 44. Очищенный второй поток активированной целлюлозы 30 может быть введен в реактор ферментационного гидролиза 40 перед, одновременно или последовательно с введением потока ферментов 42 в реактор 40. Поочередно, или дополнительно, поток ферментов 42 может быть введен в очищенный второй поток активированной целлюлозы 30, после чего комбинированный поток может быть введен в реактор ферментационного гидролиза 40.

Реактором ферментационного гидролиза 40 может быть любой реактор ферментационного гидролиза, известный из уровня техники, а также может работать с партиями или на долговременной основе. Реактор ферментационного гидролиза 40 может работать при любых условиях температуры и давления, нагрузке целлюлозы, нагрузке ферментов и т.д. Например, реактор ферментативного гидролиза 40 может работать при диапазоне температур от 40 до 55°C.

Целлюлолитические ферменты могут быть выбраны для образования мономерных сахаров из целлюлозы. Например, целлюлолитические ферменты могут быть выбраны для гидролиза 1,4-бета-D-гликозидных связей в моносахаридах. Один или несколько целлюлолитических ферментов могут включать как минимум один или несколько следующих компонентов с активностью целлобиогидролазы, эндоглюканазы и бета-глюкозидазы. В то время как приготовления целлюлолитических ферментов могут быть изолированы от числа таких источников, как природные культуры бактерий, дрожжевые грибки или грибы, специалисту в данной области техники должно быть понятно использование ферментов, полученных при помощи рекомбинантных методов. Примеры коммерчески доступных ферментов, пригодных для использования с методами, описанными здесь, включают, но не ограничиваются Novozymes Ctec 2 или 3, AB Enzymes Rohament.

Один или несколько целлюлолитических ферментов могут быть добавлены при нагрузке от 0,1 до 120 мг, от 0,2 до 60 мг, или от 1 до 30 мг белка фермента на г глюкозы. В одном варианте осуществления изобретения целлюлолитические ферменты добавляются при нагрузке от 0,1 до 5 мг белка фермента на г глюкозы в активированной целлюлозе. В другом варианте осуществления изобретения один или несколько целлюлолитических ферментов добавляются к активированной целлюлозе при нагрузке примерно от 2 до 60 единиц фильтровальной бумаги (ЕФБ)/г глюкозы, или, при необходимости, при нагрузке примерно от 2 до 30, или от 1 до 15 ЕФБ/г глюкозы. Один или несколько целлюлолитических ферментов могут быть добавлены к активированной целлюлозе непосредственно или после смешивания с сурфактантом и/или диспергентом, в соответствии с описанием.

Один или несколько целлюлолитических ферментов могут контактировать с активированной целлюлозой на протяжении подходящего периода времени (т.е. от 24-144 ч, от 48-144 ч, от 48-60 ч или от 24 до 72 ч) для преобразования целлюлозы в мономерные сахара посредством ферментативного гидролиза.

В другом варианте осуществления изобретения по крайней мере примерно 70, 75, 80, 85, 90 или 95% теоретического выхода глюкозы, на основании содержания глюкозы в активированной целлюлозе, преобразовывается в глюкозу во время ферментативного гидролиза для получения потока богатого глюкозой сахара. В других вариантах осуществления изобретения ферментативный гидролиз выполняется на протяжении определенного периода времени или до достижения определенного уровня выхода глюкозы. По истечении определенного времени уровень получения глюкозы из ферментативного гидролиза целлюлозы может снижаться по мере истощения субстрата целлюлозы или если глюкоза мешает активности целлюлолитических ферментов.

При необходимости, активированная целлюлоза может контактировать с одним или несколькими целлюлолитическими ферментами, в присутствии сурфактанта и/или диспергента. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения диспергент представляет собой полиаспаргиновую кислоту.

Было определено, что подвержение активированной глюкозы, в особенности активированной глюкозы, раскрытой здесь, ферментативному гидролизу в присутствии сурфактанта и/или диспергента, например, полиаспаргиновая кислота имеет некоторые преимущества для получения мономерных сахаров. Например, присутствие сурфактанта и/или диспергента может повысить стабильность целлюлолитических ферментов, помочь в защите целлюлолитических ферментов от ухудшения свойств, предотвратить необратимое связывание и/или улучшить активность целлюлолитических ферментов. Также считается,

что присутствие сурфактанта и/или диспергента улучшает восстановление целлюлолитических ферментов в поток рециркуляции ферментов, следуя ферментативному гидролизу. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения целлюлолитические ферменты могут использоваться для ферментативного гидролиза активированной целлюлозы, удаленной из потока богатого глюкозой сахара и рециркулированной в реактор ферментативного гидролиза 40, или контактирующей со свежей активированной целлюлозой для дальнейшего ферментативного гидролиза. В других вариантах осуществления изобретения целлюлолитические ферменты могут быть использованы и рециркулированы на протяжении по крайней мере 3 или 4 циклов ферментативного гидролиза, каждый из циклов длится от 48 до 72 ч.

Сурфактант может быть неионным поверхностно-активным веществом, при необходимости полисорбатное поверхностно-активное вещество, такое как Tween. Сурфактант также может быть смесью сурфактантов. В предпочтительном варианте осуществления изобретения сурфактант представляет собой смесь сурфактантов, таких как Tween 80, алкоксилированный глицерид и нонил фенол. В другом варианте осуществления изобретения, сурфактант присутствует в нагрузке примерно менее 2% и/или примерно выше 0,01%. В одном варианте осуществления сурфактант наблюдается при нагрузке от 1 до 0,01%, от 0,5 до 0,05% или примерно от 0,1 до 0,2% от массы содержания целлюлозы в активированной целлюлозе.

Диспергентом может быть олигопептид, при необходимости, неферментный полипептид, молекулярная масса которого составляет от 500 до 10 000 или от 1000 до 5000. Олигопептидом может быть полиаспаргиновая кислота. Полиаспаргиновая кислота может иметь молекулярную массу в диапазоне от 500 до 10 000, от 1000 до 5000 или от 3500 до 4500. Полиаспаргиновая кислота может наблюдаться при нагрузке менее 2% и/или более 0,001% от массы содержания целлюлозы в активированной целлюлозе. В некоторых вариантах осуществления полиаспаргиновая кислота наблюдается при нагрузке от 1 до 0,001%, от 0,25 до 0,025% или около 0,1% от массы содержания целлюлозы в активированной целлюлозе.

При необходимости, соотношение сурфактанта и диспергента (например, полиаспаргиновая кислота) в смеси для ферментативного гидролиза составляет от 0,1:1 до 10:1, при необходимости, от 0,5:1 до 2:1.

При необходимости, молярное соотношение диспергента (например, полиаспаргиновая кислота) и одного или нескольких целлюлолитических ферментов составляет от 0,01 до 10:1.

Соответственно смесь для ферментативного гидролиза, включающая один или несколько целлюлолитических ферментов, один или несколько сурфактантов и один или несколько диспергентов, может использоваться в любом процессе ферментативного гидролиза или может использоваться в любых изложенных здесь процессах активации и ферментативного гидролиза. В частности, смесь для ферментативного гидролиза пригодна для ферментативного гидролиза активированной целлюлозы, включающей целлюлозу II и целлюлозу IV согласно описаниям.

Один или несколько целлюлолитических ферментов, сурфактант и диспергент могут вводиться по отдельности или в комбинациях или подкомбинациях в реактор ферментативного гидролиза 40. Например, все они могут быть отдельно объединены в поток 38 или поток 38 может быть разделен на 3 потока, а целлюлолитические ферменты, сурфактант и диспергент могут быть добавлены в один из разделенных потоков) до ввода потока 38 в реактор 40. Как вариант, один или несколько целлюлолитических ферментов, сурфактант и диспергент могут быть объединены, образуя при этом поток 42 до комбинирования смеси с активированной целлюлозой (например, ввод потока 42 в реактор 40 или ввод потока 42 в поток 38 до ввода потока 38 в реактор 40). Предполагается, что комбинирование ферментов, сурфактанта и диспергента до контактирования с активированной целлюлозой упрощает образование тройного комплекса, который помогает стабилизировать фермент и предотвратить ухудшение его свойств. Соответственно один или несколько целлюлолитических ферментов могут комбинироваться с сурфактантом и диспергентом до подвержения активированной целлюлозы ферментативному гидролизу. Например, один или несколько целлюлолитических ферментов могут комбинироваться с сурфактантом и диспергентом как минимум в течение 5, 10, 30 с или 1 мин до контактирования с активированной целлюлозой (например, поток 38) или до подвержения активированной целлюлозы ферментативному гидролизу.

Как показано на фиг. 1, поток богатого глюкозой сахара 44 может быть подвергнут этапу удаления ферментов для получения потока богатого глюкозой и неферментного сахара 48 и потока рециркуляции ферментов 50. Этапом удаления ферментов может быть любой этап удаления ферментов, известный из уровня техники, который можно проводить при помощи любого оборудования, известного из уровня техники. При необходимости, этап удаления ферментов включает контактирование потока богатого глюкозой сахара 44, например, в течение ограниченного промежутка времени, с целлюлозой, которая может быть активированной целлюлозой, полученной любым изложенным здесь способом.

Например, этап удаления ферментов может включать:

(a) контактирование потока богатого глюкозой сахара, включая ферменты, с целлюлозой и получение целлюлозы с поглощенными в ней ферментами и

(b) подвержение потока богатого глюкозой сахара этапу удаления целлюлозы для получения потока богатого глюкозой и неферментного потока сахара со сниженным уровнем целлюлозы и потока рецирку-

ляции ферментов. При необходимости, этап (а) включает контактирование потока богатого глюкозой сахара с активированной целлюлозой, при необходимости, второй поток активированной целлюлозы, полученный согласно описанным здесь способам.

Не ограничиваясь теорией, предполагается, что ферменты в потоке богатого глюкозой сахара поглощаются в целлюлозу таким образом, при котором в случае удаления целлюлозы из потока богатого глюкозой сахара из потока удаляются ферменты, образуя при этом поток богатого глюкозой и неферментного сахара 48 и поток рециркуляции ферментов 50. В предпочтительном варианте осуществления целлюлолитические ферменты в потоке богатого глюкозой сахара наблюдаются в присутствии сурфактанта и диспергента, а ферменты в потоке богатого глюкозой сахара 44 удаляются путем контактирования потока богатого глюкозой сахара 44 с активированной целлюлозой 16, 24, 30, 38, полученной при помощи описанных здесь способов.

Соответственно поток целлюлозы 52 может быть введен в реактор 46. Реактор 46 может включать любой реактор, который может обеспечивать поток богатого глюкозой сахара 44 и целлюлозу для контактирования в целях удаления ферментов из раствора и разделения целлюлозы с поглощенными в ней ферментами. Соответственно, например, реактор 46 может включать реактор смешения или реактор с пробковым потоком для смешивания потока богатого глюкозой сахара и целлюлозы для получения смешанного потока 54.

Поток богатого глюкозой сахара и целлюлоза могут контактировать менее 2 ч, менее 90 или менее 60 мин и могут контактировать от 10 до 60 мин или от 30 до 90 мин.

Впоследствии смешанный поток 54 подвергается этапу разделения на жидкую и твердую фазу в сепараторе 56. Сепаратором 56 может быть любой сепаратор, известный из уровня техники. Для сепаратора 56 может использоваться любой метод разделения, известный из уровня техники, например фильтрация, декантация, гравитационное разделение, центрифугирование или использование пресса. Например, сепаратор 56 может включать фильтр, пресс, при необходимости двухшнековый пресс, двухсеточный пресс или двухвалковый пресс.

Потоком рециркуляции ферментов 50 может быть поток с высоким содержанием твердых веществ. Например, поток рециркуляции ферментов может включать примерно более 30, 40 или 50% целлюлозных твердых веществ.

Поток рециркуляции ферментов 50 может использоваться для проведения ферментативного гидролиза для свежей активированной целлюлозы. Поочередно поток рециркуляции ферментов 50 может быть рециркулирован в реактор 40. Соответственно, при работе реактора 40 с партиями поток продувки потока богатого глюкозой сахара может быть удален и обработан для получения потока рециркуляции 50. Было определено, что ферменты, рециркулированные во время этого процесса, как правило, сохраняют свою активность после одноразовой, двухразовой, трехразовой или даже четырехразовой рециркуляции. Таким образом, поток богатого глюкозой сахара 48 может включать примерно более 12, 14, 16 или 18% глюкозы. Кроме того, может быть получен выход глюкозы примерно выше 70, 80, 85, 90 или 95% от теоретического.

При необходимости, поток богатого глюкозой сахара 48 может включать предел обнаружения полиаспаргиновой кислоты. В одном варианте осуществления поток сахара включает от 1 до 10 000 мкг/г полиаспаргиновой кислоты.

Было обнаружено, что поток богатого глюкозой сахара, полученный в результате изложенного здесь ферментативного гидролиза активированной целлюлозы, содержит около 5% неглюкозных сахаров, которыми являются один или несколько компонентов из числа ксилозы, олигомеров ксилозы (ксилоолигосахариды) и ксилана. Ксилоолигосахариды, согласно описаниям, относятся к полимерам ксилозы со степенью полимеризации (сп) примерно от 2 до 10. Ксилан, согласно описаниям, относится к полимерам ксилозы со степенью полимеризации (сп) >10.

В определенном аспекте ферментативный гидролиз активированной целлюлозы может проводиться с использованием изложенной здесь смеси для гидролиза. В дополнительном аспекте подготовка потока богатого глюкозой сахара осуществляется при помощи способа активации целлюлозы и/или описанного здесь способа гидролиза ферментов.

Как известно, глюкоза, полученная от источников, например кукуруза, при помощи стандартных способов, содержит около 5% неглюкозных сахаров. Тем не менее, неглюкозными сахарами, найденными в глюкозе, полученной из кукурузы, являются сахара с более высоким гликемическим индексом, например мальтоза, мальтотриоза, более насыщенные сахараиды декстрозы.

В одном варианте осуществления неглюкозные сахара, найденные в изложенном здесь потоке богатого глюкозой сахара, включают примерно 1-8, 2-7 или 3-6% сухого вещества состава и представляют собой один или несколько компонентов из числа ксилозы, ксилоолигосахаридов и ксилана. В конкретном варианте осуществления было обнаружено, что сухое вещество потока богатого глюкозой сахара включает 95% глюкозы, 4% ксилозы, 1% ксилоолигосахаридов.

Глюкоза, полученная изложенными здесь способами, может быть преобразована в фруктозу при помощи известных способов, например, изомеризация глюкозы в фруктозу, согласно описаниям, пред-

ставленным, например, С.З. Дзидзич и соавт. "Руководство по продуктам гидролиза крахмала и их производным продуктам", выданное 31 декабря 1995 г., стр. 55-58, которое включено посредством ссылки. Было обнаружено, что фруктоза, полученная в результате преобразования глюкозы, полученной изложенными здесь способами, также содержит около 3-5% неглюкозного сахара, являющегося ксилозой и/или олигомерами ксилозы.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предусмотрен поток богатого фруктозой сахара, подготовленный путем преобразования глюкозы в изложенном здесь потоке богатой глюкозой сахара в фруктозу. Поток богатой фруктозой сахара также включает нефруктозный сахар, отличающийся тем, что нефруктозный сахар представлен одним или несколькими компонентами из числа ксилозы, ксилоолигосахарида и ксилана. В одном варианте осуществления нефруктозные сахара включают примерно 1-8, 2-7 или 3-6% сухого вещества в составе.

В соответствии с другим аспектом изобретения предусмотрен продукт глюкозы или продукт фруктозы с более низким гликемическим индексом, отличающийся тем, что продукт глюкозы или продукт фруктозы включает примерно 1-8, 2-7 или 3-6%, предпочтительно 5% неглюкозного или нефруктозного сахара и, отличающийся тем, что неглюкозным или нефруктозным сахаром является один или несколько компонентов из числа ксилозы, ксилоолигосахаридов и ксилана.

В дополнительном аспекте гликемический индекс продукта глюкозы или продукта фруктозы ниже гликемического индекса стандартной глюкозы или фруктозного сиропа, полученного обычным образом. Гликемический индекс (ГИ) может быть измерен при помощи способов, известных из уровня техники, например, как описано в статье "Метод *in vitro* для прогнозирования гликемического индекса продуктов питания с использованием смоделированной модели переваривания и искусственной нейронной сети" Р.Л. Магалетты и соавт., журнал *Cereal Chemistry* ("Химия зерновых культур"), т. 87, № 4, 2010 г.

Продукт глюкозы или продукт фруктозы, полученный описанными здесь способами, может использоваться вместо глюкозы или фруктозы с более высоким гликемическим индексом при производстве различных продуктов питания и напитков для получения продукта с более низким гликемическим индексом. Продукты питания и напитки с более низким гликемическим индексом могут обеспечивать преимущества для здоровья при управлении уровнями сахара и инсулина в крови, что, в свою очередь, может снизить риск сердечно-сосудистых заболеваний и/или диабета. Продукты питания с более низким гликемическим индексом также могут быть полезными при контроле аппетита и потере веса.

Следует принять во внимание, что один или несколько описанных вариантов осуществления для активации целлюлозного сырья можно использовать вместе с одним или несколькими описанными вариантами осуществления для ферментативного гидролиза целлюлозы для получения целлюлозных сахаров из целлюлозного сырья.

Вышеописанное предназначено для наглядного представления изобретения и неограничивающего примера и специалистам в данной области техники будет понятно, что другие варианты и модификации могут предусматриваться без отступления от объема настоящего изобретения, как определено в приложенной формуле. Объем формулы изобретения не должен ограничиваться предпочтительными вариантами осуществления и примерами, но должен обладать наиболее широким толкованием, соответствующим данному описанию в целом.

Несмотря на то, что вышеуказанное, как правило, является описанием настоящей заявки, более полное понимание может быть обеспечено со ссылкой на следующие конкретные примеры. Описание этих примеров представлено исключительно для наглядности, а примеры не ограничивают объем настоящего изобретения. Изменения формы и замена эквивалентов рассматриваются как обстоятельства, которые могут предлагать или предусматривать способ. Несмотря на использование определенных терминов, они предназначены в целях описания, а не в целях ограничения.

Следующие неограничивающие примеры наглядно представляют настоящее изобретение:

#### Примеры

Пример 1. Обработка жома сахарного тростника для активации целлюлозы

Различные способы для активации целлюлозы были исследованы с использованием жома сахарного тростника. Жом сахарного тростника подвергся первому этапу паровой обработки при 220°C с продолжительностью обработки 5 мин, после чего промывался горячей водой при 80°C или первой паровой обработке, затем обработке щелочной перекиси водорода. Промывание щелочью при 90°C, 60 или 120 мин и пероксидная нагрузка на твердые вещества 1%.

Как показано в табл. 1, использование двухэтапной паровой обработки, за которой последовала обработка щелочной перекиси водорода, позволило существенно повысить уровень глюкана и снизить количество лигнина относительно паровой обработки и промывания горячей водой.

Таблица 1. Воздействие обработки щелочной перекиси на химический состав нерастворимых в воде компонентов жома сахарного тростника\*, прошедшего предварительную паровую обработку и последующее промывание горячей водой (% массы в сухом состоянии). ЦПВ-60 и ЦПВ-120 относятся к 60- и 120-минутным обработкам.

	После предварительной паровой обработки и промывания горячей водой	щПВ – 60*	щПВ – 120**
Арабинан	НПО****	НПО	НПО
Галактан	НПО	НПО	НПО
Глюкан	48,3 (0,7)	79,3 (1,4)	78,2 (0,7)
Ксилан	3,6 (0,1)	3,7 (0,1)	3,7 (0,1)
Маннан	НПО	НПО	НПО
Лигнин (кислотонерастворимый)**	41,6 (1,6)	12,9 (0,3)	12,9 (0,3)
Кислоторастворимый лигнин	0,7 (0,0)	0,6 (0,0)	0,5 (0,0)
Зола	3,2 (0,4)	1,7 (0,4)	1,9 (0,7)

\* Обработка щелочной перекиси водорода  
 \*\* Обработка щелочной перекиси водорода  
 \*\*\*Незначительная часть лигнина может содержать компоненты золы  
 \*\*\*\*Ниже предела обнаружения

#### Пример 2. Ферментативный гидролиз активированного жома сахарного тростника

Затем нерастворимые в воде целлюлозные компоненты, подготовленные в примере 1, подвергались ферментативному гидролизу в течение 72 ч. Кроме того, в смесь для ферментативного гидролиза для жома сахарного тростника, подвергнутого щелочной обработке, была добавлена присадка Comet S-001, включающая смесь сурфактанта Tween 80 и полиаспаргиновая кислота диспергента с ММ 3500-4500 при соотношении 1:1.

Как показано в табл. 2, ферментативный гидролиз жома сахарного тростника, подвергнутого щелочной обработке, при наличии присадки Comet S-001 характеризовался выходом глюкозы 105,1 г глюкозы на грамм глюкана с приближением к теоретическому выходу ~110 г глюкозы на грамм глюкана.

Таблица 2. Мономерный выход глюкозы после ферментативного гидролиза на протяжении 72 ч нерастворимых в воде целлюлозных компонентов жома сахарного тростника после предварительной паровой обработки и последующей щелочно-перекисной обработки (выражено как г на 100 г глюкана\*\*).

Субстрат	Выход глюкозы
Жом сахарного тростника после промывания горячей водой	79,1 (2,6)***
Жом сахарного тростника после щелочной обработки + присадка Comet S-001	105,1 (1,5)

\* Нагрузка целлюлазы: 31 мг белка на 1 г глюкана  
 \*\*100 г глюкана в принципе должно высвобождать ~110 г глюкозы.  
 \*\*\*\*Значения в скобках представляют стандартные отклонения трех экземпляров

Кроме того, как показано в табл. 3, ферментативный гидролиз при наличии присадки Comet S-001 не привел к изменению выхода мономерной ксилозы в сравнении с жомом сахарного тростника после щелочной обработки, подвергнутому ферментативному гидролизу без присадки. Соответственно присадка не оказала отрицательное воздействие на выход.

Таблица 3. Мономерный выход ксилозы после ферментативного гидролиза на протяжении 72 ч\* нерастворимых в воде целлюлозных компонентов жома сахарного тростника после предварительной паровой обработки и последующей щелочно-перекисной обработки (выражено как г на 100 г субстрата\*\*).

Субстрат	Выход ксилозы
Жом сахарного тростника после щелочной обработки	2,7 (0,2)***
Жом сахарного тростника после щелочной обработки + присадка Comet S-001	2,7 (0,1)

\*См. таблицу 2 для ознакомления с условиями ферментативного гидролиза  
 \*\*100 г субстрата в принципе должно высвобождать 4,1 г ксилозы (см. таблицу 1 для ознакомления с содержанием ксилана).  
 \*\*\*\*Значения в скобках представляют стандартные отклонения трех экземпляров

Анализ части общего количества белка в супернатанте после ферментативного гидролиза на протя-

жении 72 часов представлен в табл. 4. Использование присадки Comet S-001 характеризовалось наличием большей части общего количества белка, свидетельствуя о более высоких уровнях ферментов в супернатанте и повышенной стабильностью ферментов.

Таблица 4. Часть общего количества белка в супернатанте после 72 ч (выражено как г на 100 г добавленного белка\*\*).

	Часть общего количества белка в жидкости
Жом сахарного тростника после промывания горячей водой	-
Жом сахарного тростника после щелочной обработки	61,2 (2,2)
Жом сахарного тростника после щелочной обработки + присадка Comet S001	77,2 (1,1)**

\*\*Значения в скобках представляют стандартные отклонения трех экземпляров

Жом сахарного тростника после щелочной обработки был подвергнут нескольким циклам гидролиза рециркуляции при наличии присадки Comet S-001. Как показано в табл. 5, гидролиз рециркуляции мог обеспечивать высокий выход и высокую концентрацию глюкозы при минимальной потере ферментов при повторных циклах ферментативного гидролиза.

Таблица 5. Результаты гидролиза рециркуляции (всего 16% глюкана)\* нерастворимых в воде целлюлозных компонентов жома сахарного тростника после предварительной паровой обработки и последующей щелочно-перекисной обработки

Интервал гидролиза и добавление субстрата	Выход глюкозы (%)	Концентрация глюкозы (% масс./об.)	Выход ксилозы***	Растворимые твердые вещества (масс./масс.)	Часть количества белка в супернатанте*****
После 48 часов**	83,9 (1,4)****	16,1 (0,3)	1,9 (0,2)	19,1 (0,2)	58,4 (1,3)
После следующих 48 часов	83,1 (0,9)	15,9 (0,2)	2,2 (0,0)	18,8 (0,2)	60,1 (2,4)
После следующих 48 часов	90,9 (0,3)	18,2 (0,1)	2,5 (0,0)	20,9 (0,1)	64,2 (0,8)
После следующих 48 часов	92,3 (2,1)	18,1 (0,4)	2,3 (0,1)	20,7 (0,5)	67,7 (1,5)

\*нагрузка глюкана 16 % (нагрузка твердых веществ ~20 %) субстрата после щелочной обработки. Реакция проводилась при полной шкале 20 л.  
 \*\*Нагрузка целлюлазы: 31 мг белка на 1 г глюкана, добавленного в начале гидролиза. 0,2 % S-001 в реакционной смеси, 6 мг дополнительного белка фермента на рециркуляцию  
 \*\*\*выражено как г на 100 г субстрата. 100 г субстрата в принципе должно высвободить 4,1 г ксилозы (см. таблицу 1 для ознакомления с содержанием ксилана).  
 \*\*\*\*Значения в скобках представляют стандартные отклонения трех экземпляров  
 \*\*\*\*\*Не учитывается фермент, поглощенный на субстрате

### Пример 3. Обработка пшеничной соломы для активации целлюлозы

Способы активации целлюлозного сырья были исследованы с использованием пшеничной соломы. Пшеничная солома подверглась первому этапу паровой обработки при 220°C с продолжительностью обработки 5 мин, после чего промывалась горячей водой при 80°C, затем щелочью при 90°C на протяжении 60 мин и пероксидной нагрузке на твердые вещества 1%.

Как показано на табл. 6, использование обработки щелочной перекиси водорода приводит к образованию нерастворимых в воде компонентов с высоким уровнем глюкана (75,1%).

Таблица 6. Химический состав нерастворимых в воде компонентов пшеничной соломы\*, прошедшей предварительную паровую обработку и последующую щелочно-перекисную обработку (% массы в сухом состоянии)

Арабинан	НПО***
Галактан	НПО
Глюкан	75,1 (0,6)
Ксилан	8,1 (0,1)
Маннан	НПО
Лигнин (кислотонерастворимый)**	13,5 (0,4)
Кислоторастворимый лигнин	0,4 (0,0)
Зола	1,2 (0,3)
<p>*Выход твердых веществ после обработки перекисью составил 75,7. Щелочно-перекисная обработка проводилась при однородности 10 %, pH 11,5 и 1 % раствором перекиси водорода, при 80°C на протяжении 2 часов.  **Незначительная часть лигнина может содержать компоненты золы  ***Ниже предела обнаружения</p>	

Пример 4. Ферментативный гидролиз активированной пшеничной соломы

Нерастворимые в воде компоненты целлюлозы пшеничной соломы после паровой обработки или пшеничной соломы после паровой обработки и последующей щелочной обработки подверглись ферментативному гидролизу, согласно табл. 7-9. Сурфактант Tween 80 также был добавлен, как отмечается в таблице.

Таблица 7. Мономерный выход глюкозы во время ферментативного гидролиза (нагрузка глюкана 10%)\* нерастворимых в воде целлюлозных компонентов пшеничной соломы после предварительной паровой обработки и последующей щелочно-перекисной обработки (выражено как г на 100 г глюкана\*\*).

	24 часа	72 часа
Пшеничная солома после промывания горячей водой	----****	85,0 (2,1)
Пшеничная солома после промывания горячей водой + Tween 80***	----	89,1 (0,5)
Пшеничная солома после обработки перекисью	83,7 (1,1)*****	97,0 (0,3)
Пшеничная солома после обработки перекисью + Tween 80	90,4 (0,1)	102,3 (2,9)
<p>*Нагрузка твердых веществ 13,3 % для субстрата после обработки перекисью и нагрузка твердых веществ 17,9 % для пшеничной соломы после предварительной паровой обработки для получения нагрузки глюкана 10%. Нагрузка целлюлазы: 31 мг белка (СТес 2) на 1 г глюкана  **100 г глюкана в принципе должно высвобождать ~110 г глюкозы.  ***Tween 80 0,2 % в реакционной смеси  ****Был не достаточно жидким для получения репрезентативной пробы для анализа  *****Значения в скобках представляют стандартные отклонения</p>		

Таблица 8. Мономерный выход ксилозы после ферментативного гидролиза на протяжении 72 ч\*\*\* (нагрузка глюкана 10%)\* нерастворимых в воде целлюлозных компонентов пшеничной соломы после предварительной паровой обработки и последующей щелочно-перекисной обработки (выражено как г на 100 г субстрата\*\*)

	Выход ксилозы
Пшеничная солома после промывания горячей водой	6,1 (0,0)
Пшеничная солома после промывания горячей водой + Tween 80	6,3 (0,2)
Пшеничная солома после щелочно-перекисной обработки	5,8 (0,0)
Пшеничная солома после щелочно-перекисной обработки + Tween 80	6,0 (0,1)

Таблица 9: Растворимые твердые вещества в 72-часовом ферментативном гидролизе пшеничной соломы после предварительной паровой обработки и последующей щелочно-перекисной обработки (% мас./мас.)

	Растворимые твердые вещества (% масс./масс.)
Пшеничная солома после промывания горячей водой	13,8 (0,1)
Пшеничная солома после промывания горячей водой + Tween 80	12,3 (0,0)
Пшеничная солома после щелочно-перекисной обработки	14,1 (0,2)
Пшеничная солома после щелочно-перекисной обработки + Tween 80	13,9 (0,1)

Дальнейшие исследования ферментативного гидролиза пшеничной соломы после паровой обработки и последующей щелочно-перекисной обработки с добавлением сурфактанта (Tween 80) проводились в соответствии с табл. 10-12.

Таблица 10. Мономерный выход глюкозы во время подпитываемого ферментативного гидролиза (нагрузка глюкозы 10%)\* нерастворимых в воде целлюлозных компонентов пшеничной соломы после предварительной паровой обработки и последующей щелочно-перекисной обработки с добавлением Tween 80 (выражено как г на 100 г глюкозы\*\*)

	После первых 36 часов	После первых 24 часов	После первых 24 часов	После первых 24 часов
Выход глюкозы***	93,4 (0,5)***	72,7 (1,3)	61,5 (0,7)	49,7 (2,8)
Растворимые твердые вещества	12,9 (0,1)	10,0 (0,1)	8,4 (0,0)	6,9 (0,3)
<p>*Нагрузка твердых веществ 13,3 % для субстрата после перекисной обработки для получения нагрузки глюкозы 10 %. Tween 80 0,2 % в реакционной смеси только в начале. Нагрузка целлюлазы: 31 мг белка (СТес 2) на 1 г глюкозы и 3,1 мг/г глюкозы перед добавлением свежей партии субстратов.            ***100 г глюкозы в принципе должно высвобождать ~110 г глюкозы.            ****Значения в скобках представляют стандартные отклонения</p>				

Таблица 11. Мономерный выход ксилозы во время подпитываемого ферментативного гидролиза на протяжении (10% нагрузка глюкозы)\* нерастворимых в воде целлюлозных компонентов пшеничной соломы после предварительной паровой обработки и последующей щелочно-перекисной обработки (выражено как г на 100 г общего количества субстрата, используемого для гидролиза в каждой стадии)

После первых 36 часов ферментативного гидролиза	5,5 (0,1)
После следующих 24 часов	4,3 (0,0)
После следующих 24 часов	3,6 (0,1)
После следующих 24 часов	2,9 (0,0)

Таблица 12. Часть общего количества белка в супернатанте перед добавлением каждой партии свежих субстратов и ферментов (выражено как % общего количества добавленного белка\*\*).

	Подпитываемый гидролиз*				Гидролиз партии**
	После первых 36 часов	После следующих 24 часов	После следующих 24 часов	После следующих 24 часов	По истечении 72 часов
Часть общего количества белка в жидкости	61,6 (1,1)	63,3 (0,5)	63,1 (1,7)	66,2 (2,4)	72,7 (2,8)
<p>*31,1 мг нагрузки белка/г целлюлозы первой партии гидролиза и 3,1 мг белка/г целлюлозы перед добавлением каждой свежей партии субстратов. Глюкан с однородностью 10 % в первые 36 часов, после чего добавляется 10 % глюкозы каждые последующие 24 часа.            **Нагрузка белка: 31,1 мг/г целлюлозы и глюкозы с однородностью 10 %</p>					

Пример 5.

Продукт целлюлозной глюкозы, получаемый способами активации и ферментативной конверсии, описанными здесь, был подготовлен и были определены его следующие характеристики:

**Химические и физические данные**

Общее количество твердых веществ 50-70%

Влажность 30-50%

Состав (на основе сухого вещества):

Глюкоза	95 %
Ксилоза	4 %
Ксилоолигосахарид	1 %
Зола	<0,01 %
рН:	3-5
Проводимость:	(30 % РТЧ) 50 мкСм/см
Удельная плотность:	1,2
Вид:	чистый раствор
Запах:	сладковатый

Содержание минеральной золы (мкг/г):

Хлорид	16
Сульфат	<1
Кальций	5
Калий	<1
Магний	<1
Натрий	2
Фосфор	2

**Данные гликемического индекса**

Обнаружен продукт целлюлозной глюкозы, имеющий состав, описанный выше, с гликемическим индексом (ГИ) 72. В то время как глюкоза сама по себе имеет гликемический индекс 100. Известно, что декстроза также имеет гликемический индекс 100, в то время как мальтоза и мальтодекстрин -105 и 110 соответственно.

Настоящее изобретение описано со ссылкой на представленные здесь примеры. Следует понимать, что изобретение не ограничивается указанными примерами. Напротив, изобретение рассчитано на охват различных модификаций и эквивалентных исполнений, включенных в существо и объем приложенной формулы.

Все публикации, патенты и заявки на патенты полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки в одинаковом объеме, как если бы каждая публикация, патент или заявка на патент были особым образом и отдельно указаны для включения в настоящую заявку посредством ссылки.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ получения обогащенного глюкозой потока сахара из активированной целлюлозы, включающий ферментативный гидролиз активированной целлюлозы с одним или несколькими целлюлолитическими ферментами, сурфактантом и полиаспаргиновой кислотой для получения обогащенного глюкозой сахара, при этом обогащенный глюкозой поток сахара содержит раствор глюкозы.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве целлюлолитических ферментов выбирают один или несколько целлюлолитических ферментов для гидролиза 1,4-бета-D-гликозидных связей в моносахаридах.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что один или несколько целлюлолитических ферментов включают как минимум один или несколько следующих компонентов с активностью целлобиогидролазы, эндоглюканазы и бета-глюкозидазы.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что полиаспаргиновая кислота обладает молекулярной массой от 500 до 10000.

5. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что полиаспаргиновая кислота обладает молекулярной массой от 1000 до 5000.

6. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что полиаспаргиновая кислота обладает молекулярной массой от 3500 до 4500.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что полиаспаргиновая кислота наблюдается при нагрузке менее 2%, между 1 и 0,001%, между 0,25 и 0,025% или приблизительно 0,1% от массы содержания целлюлозы в активированной целлюлозе.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что сурфактант - это неионное поверхностно-активное вещество.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что сурфактант - это полисорбтантное поверхностно-активное вещество.

10. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что сурфактант - это поверхностно-активное вещество, представляющее собой Tween™.

11. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что сурфактант - это смесь сурфактантов, включающая Tween™, алкоксилированный глицерид и нонил фенол.

12. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что сурфактант наблюдается при нагрузке

менее 2%, между 1 и 0,01%, между 0,5 и 0,05% или приблизительно 0,1-0,2% от массы содержания целлюлозы.

13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что один или несколько целлюлолитических ферментов, сурфактант и полиаспаргиновая кислота по отдельности добавляют в активированную целлюлозу.

14. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что один или несколько целлюлолитических ферментов смешиваются с сурфактантом и полипептидом до подвержения активированной целлюлозы ферментативному гидролизу.

15. Способ по п.12, отличающийся тем, что один или несколько целлюлолитических ферментов смешиваются с сурфактантом и полипептидом при необходимости как минимум в течение 10 с до подвержения активированной целлюлозы ферментативному гидролизу

16. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что один или несколько целлюлолитических ферментов наблюдаются при нагрузке 0,1-5 мг белка-фермента на грамм глюкозы.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что один или несколько целлюлолитических ферментов наблюдаются при нагрузке 2-60 ЕФБ/г глюкозы.

18. Способ по любому из пп.1-17, дополнительно включающий подвержение активированной целлюлозы ферментативному гидролизу в течение 24-144 ч, 48-144 ч, 48-60 ч, 24-96 ч, менее 60 или менее 48 ч.

19. Способ по любому из пп.1-18, включающий дополнительную обработку обогащенного глюкозой потока сахара с удалением ферментов для разделения ферментов и глюкозы с получением:

(а) обогащенного глюкозой не содержащего ферменты потока сахара, содержащего раствор глюкозы,

(b) ферментного потока рециркуляции, включающего ферменты, и с возвратом ферментного потока рециркуляции для использования в ферментативном гидролизе.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что после ввода потока рециркуляции ферментов для использования в ферментативном гидролизе в процессе получается выход глюкозы выше теоретического приблизительно на 70, на 80, на 90 или на 95%.

21. Способ по п.19 или 20, включающий:

(а) контакт обогащенного глюкозой потока сахара с целлюлозой для формирования целлюлозы с поглощенными в ней ферментами в обогащенном глюкозой сахаре и

(b) удаление из обогащенного глюкозой потока сахара целлюлозы для получения

(i) обогащенного глюкозой не содержащего ферменты потока сахара со сниженным уровнем целлюлозы, содержащего раствор глюкозы,

(ii) потока рециркуляции ферментов, содержащего целлюлозу с поглощенными в ней ферментами.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что поток обогащенного глюкозой сахара подвергается контакту с активированной целлюлозой.

23. Способ по п.21 или 22, отличающийся тем, что этап удаления целлюлозы включает в себя фильтрацию.

24. Способ по любому из пп.19-23, дополнительно включающий комбинирование потока рециркуляции ферментов и свежей активированной целлюлозы.

25. Способ по любому из пп.1-24, отличающийся тем, что обогащенный глюкозой поток сахара включает примерно более 12, 14, 16 или 18% глюкозы.

26. Способ по любому из пп.1-25, отличающийся тем, что выход глюкозы выше примерно 70, 80, 85, 90 или 95%.

27. Способ получения богатого глюкозой сахара, включающий:

(а) получение потока активированной целлюлозы, включающей смесь целлюлозы II, гидратцеллюлозы II и щелочной целлюлозы IV и воду;

(b) ферментативный гидролиз активированного потока целлюлозы с одним или несколькими целлюлолитическими ферментами, сурфактантом и полиаспаргиновой кислотой для получения потока обогащенного глюкозой сахара.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что поток активированной целлюлозы получают посредством двухэтапного способа для активации целлюлозного сырья, включающего:

(а) прохождение первого этапа активации сырья, на котором сырье обрабатывается в присутствии воды при температуре более 190°C и под давлением более 200 фунтов/кв.дюйм для получения первого потока активированной целлюлозы, включающего целлюлозу II и нерастворимые твердые вещества; и

(b) прохождение первым потоком активированной целлюлозы второго этапа активации, на котором первый поток активированной целлюлозы обрабатывается щелочью при более низкой температуре, чем на первом этапе активации, для получения второго потока активированной целлюлозы, включающего целлюлозу IV.

29. Способ по п.27 или 28, отличающийся тем, что полиаспаргиновая кислота имеет молекулярную массу менее 10000.

30. Способ по любому из пп.27-28, отличающийся тем, что полиаспаргиновая кислота наблюдается

при нагрузке менее 2%, от 1 до 0,001%, от 0,25 до 0,025% или приблизительно 0,1% от массы содержания целлюлозы в потоке активированной целлюлозы.

31. Способ по п.27, отличающийся тем, что полиаспаргиновая кислота обладает молекулярной массой от 1000 до 5000.

32. Способ по п.27, отличающийся тем, что полиаспаргиновая кислота обладает молекулярной массой от 3500 до 4500.

33. Способ по любому из пп.27-32, отличающийся тем, что сурфактант наблюдается при нагрузке менее 2%, от 1 до 0,01%, от 0,5 до 0,05% или приблизительно 0,1-0,2% от массы содержания целлюлозы в потоке активированной целлюлозы.

34. Способ по любому из пп.27-33, отличающийся тем, что сурфактант - это неионное поверхностно-активное вещество.

35. Способ по любому из пп.27-34, отличающийся тем, что сурфактант - это полисорбатное поверхностно-активное вещество.

36. Способ по любому из пп.27-34, отличающийся тем, что сурфактант - это поверхностно-активное вещество, такое как Tween.

37. Способ по любому из пп.27-34, отличающийся тем, что сурфактант - это смесь сурфактантов, включающая Tween, алкоксилированный глицерид и нонил фенол.

38. Способ по любому из пп.27-37, отличающийся тем, что один или несколько целлюлолитических ферментов, сурфактант и полиаспаргиновую кислоту по отдельности добавляют в активированную целлюлозу.

39. Способ по любому из пп.27-38, отличающийся тем, что один или несколько целлюлолитических ферментов комбинируются с сурфактантом и полиаспаргиновой кислотой до подвержения активированной целлюлозы ферментативному гидролизу.

40. Способ по п.39, отличающийся тем, что один или несколько целлюлолитических ферментов комбинируются с сурфактантом и полиаспаргиновой кислотой как минимум в течение 10 с до подвержения активированной целлюлозы ферментативному гидролизу.

41. Способ по любому из пп.27-40, дополнительно включающий подвержение потока обогащенного глюкозой сахара обработке с удалением ферментов для разделения ферментов и глюкозы и получения:

(а) потока обогащенного глюкозой и не содержащего ферменты сахара, включающего раствор глюкозы, и

(b) потока рециркуляции ферментов, содержащего ферменты.

42. Способ по любому из пп.27-41, отличающийся тем, что богатый глюкозой сахар включает примерно более 12, 14, 16 или 18% глюкозы.

43. Способ по любому из пп.27-41, отличающийся тем, что выход глюкозы примерно выше 70, 80, 85, 90 или 95%.

44. Смесь для ферментативного гидролиза, включающая:

(а) один или несколько целлюлолитических ферментов;

(b) сурфактант или смесь сурфактантов и

(с) полиаспаргиновую кислоту с молекулярной массой от 500 до 10000.

45. Смесь по п.44, отличающаяся тем, что один или несколько целлюлолитических ферментов гидролизуют 1,4-бета-D-гликозидные связи в моносахариды.

46. Смесь по п.44 или 45, отличающаяся тем, что один или несколько целлюлолитических ферментов включают фермент с активностью одного или нескольких компонентов из числа целлюлогидролазы, эндоглюканазы и бета-глюкозидазы.

47. Смесь по любому из пп.44-46, отличающаяся тем, что полиаспаргиновая кислота обладает молекулярной массой от 1000 до 5000.

48. Смесь по любому из пп.44-47, отличающаяся тем, что сурфактант - это неионное поверхностно-активное вещество,

49. Смесь по любому из пп.44-48, отличающаяся тем, что сурфактант - это полисорбатное поверхностно-активное вещество.

50. Смесь по любому из пп.44-48, отличающаяся тем, что сурфактант - это поверхностно-активное вещество, представляющее собой Tween<sup>TM</sup>.

51. Смесь по любому из пп.44-50, отличающаяся тем, что соотношение сурфактанта к полиаспаргиновой кислоте составляет от 0,1:1 до 10:1, при необходимости от 0,5:1 до 2:1.

52. Сахар, обогащенный глюкозой, полученный способом по любому из пп.1-51, при этом сухое вещество потока богатого глюкозой сахара включает около 95% глюкозы и около 5% неглюкозных сахаров.

53. Сахар по п.52, отличающийся тем, что включает более 12, 14, 16 или 18% глюкозы.

54. Сахар по п.52 или 53, отличающийся тем, что включает полиаспаргиновую кислоту.

55. Сахар по любому из пп.52-54, отличающийся тем, что присутствует полиаспаргиновая кислота в концентрации от 1 до 10000 мкг/г.

56. Сахар по любому из пп.52-55, отличающийся тем, что неглюкозные сахара представлены одним

или несколькими компонентами из числа ксилозы, ксилоолигосахаридов или ксилана.

57. Глюкозный сироп, включающий примерно 95% глюкозы и примерно 5% неглюкозного сахара, отличающийся тем, что неглюкозный сахар представлен одним или несколькими компонентами из числа ксилозы, ксилоолигосахаридов и ксилана.

58. Фруктозный сироп, включающий примерно 95% смеси глюкозы с фруктозой и примерно 5% негексозного сахара, отличающийся тем, что негексозный сахар представлен одним или несколькими компонентами из числа ксилозы, ксилоолигосахаридов и ксилана.

59. Фруктозный сироп по п.58, приготовленный посредством изомеризации богатого глюкозой сахара по любому из пп.52-58, или глюкозный сироп по п.57.

