

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090420** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.30

(51) Int. Cl. *C12P 19/02* (2006.01)
D21C 3/26 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.04.29

(54) СПОСОБ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО МАТЕРИАЛА И ФЕРМЕНТАЦИИ САХАРОВ

(31) **14166538.0; 14166539.8; 14166545.5;
14167284.0; 14167483.8**

(72) Изобретатель:
**Нордам Бертус, Беверс Лус Элизабет,
Партон Рюди Франсуа Мария Йозеф,
Беркхаут Михаэл Петрус Йозеф (NL)**

(32) **2014.04.30; 2014.04.30; 2014.04.30;
2014.05.07; 2014.05.08**

(33) **EP**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(62) **201891512; 2015.04.29**

(71) Заявитель:
ДСМ АйПи АССТС Б.В. (NL)

(57) Изобретение относится к способу получения продукта ферментации из лигноцеллюлозного материала, включающему следующие этапы: (a) необязательно, предварительной обработки лигноцеллюлозного материала; (b) необязательно, промывания необязательно подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала; (c) ферментативного гидролиза необязательно промытого и/или необязательно подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала с применением ферментной композиции, включающей по меньшей мере две целлюлазы, и при этом ферментная композиция, по меньшей мере, содержит ЛПМО, и необязательно очистки гидролизованного лигноцеллюлозного материала, (d) ферментации гидролизованного лигноцеллюлозного материала до получения продукта ферментации, и (e) необязательно, извлечения продукта ферментации; где количество образованных гидролизованных продуктов окисления в конце ферментативного гидролиза путем окисления ЛПМО лигноцеллюлозного материала, содержащего целлюлозу и/или целлоолигосахариды, поддерживают от 3 до 80 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, путем добавления подходящего количества кислорода после предварительной обработки и до и/или во время ферментативного гидролиза к лигноцеллюлозному материалу; предпочтительно образующимся гидролизованным продуктом окисления является глюконовая кислота, альдоновая кислота и/или геминальный диол, более предпочтительно гидролизованным продуктом окисления является глюконовая кислота.

A2

202090420

202090420

A2

СПОСОБ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО МАТЕРИАЛА И ФЕРМЕНТАЦИИ САХАРОВ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к способу ферментативного гидролиза лигноцеллюлозного материала и ферментации сахаров.

Предшествующий уровень техники

Лигноцеллюлозный растительный материал, также называемый сырьевым материалом, является возобновляемым источником энергии в форме сахаров, которые можно превратить в ценные продукты, например, сахара или биотопливо, такое как биоэтанол. Во время этого процесса (лигно- или геми-)целлюлоза, присутствующая в исходном сырье, таком как пшеничная солома, кукурузная солома, рисовая шелуха и т.д., превращается в восстанавливающие сахара посредством (геми)целлюлолитических ферментов, которые затем необязательно превращаются в ценные продукты, такие как этанол, посредством таких микроорганизмов, как дрожжи, бактерии и грибки.

Поскольку (геми)целлюлоза является кристаллической и встроена в сеть лигнина, превращение в восстанавливающие сахара является в целом медленным и неполным. Как правило, ферментативный гидролиз необработанного сырьевого материала дает меньше 20% от теоретического количества сахаров. При использовании химической и термофизической предварительной обработки (геми)целлюлоза становится более доступной для (геми)целлюлолитических ферментов, и таким образом, превращения проходят быстрее и с более высоким выходом.

Типичный выход этанола из глюкозы, полученной из предварительно обработанной кукурузной соломы, составляет 40 галлонов этанола на 1000 кг сухой кукурузной соломы (Badger, P, «Ethanol from cellulose: a general review, Trends in new crops and new uses», 2002, J. Janick and A. Whipkey (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA) («Этанол из целлюлозы: общий обзор; направления в новых сельскохозяйственных культурах и новых видах применения»)) или 0,3 г этанола на г сырьевого материала. Максимальный выход этанола на основе целлюлозы составляет примерно 90%.

Целлюлолитические ферменты - большинство из них вырабатываются такими видами, как *Trichoderma*, *Humicola* и *Aspergillus* - коммерчески применяются для превращения предварительно обработанного сырьевого материала в затор, содержащий нерастворимую (геми)целлюлозу, восстанавливающие сахара, полученные из неё, и лигнин. Термостабильные целлюлолитические ферменты, полученные из *Rasamsonia*,

применяются для деградации лигноцеллюлозного сырьевого материала, и эти ферменты известны своей термостабильностью, см. WO 2007/091231. Полученный затор применяют в ферментации, во время которой восстанавливающие сахара превращаются в дрожжевую биомассу (клетки), диоксид углерода и этанол. Этанол, полученный таким способом, называется биоэтанолом.

Общее получение сахаров из предварительно обработанного лигноцеллюлозного сырьевого материала, гидролиз, также называемый ожижением, предварительным осахариванием или осахариванием, как правило, происходит во время процесса, занимающего от 6 до 168 часов (Kumar, S. Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526) при повышенных температурах от 45 до 50°C и в нестерильных условиях. Во время этого гидролиза присутствующая целлюлоза частично (как правило, от 30 до 95%, в зависимости от активности фермента и условий гидролиза) превращается в восстанавливающие сахара. В случае ингибирования ферментов соединениями, присутствующими в предварительно обработанном исходном материале, и высвобождающимися сахарами, и для минимизации термической инактивации, этот период повышенной температуры как можно сильнее сокращают.

Ферментацию после гидролиза проводят на отдельном, предпочтительно анаэробном этапе способа, в том же самом или в другом сосуде, температуру которого доводят до 30-33°C (мезофильный процесс) для приспособления к росту и продукции этанола микробной биомассой, обычно дрожжами. Во время этого процесса ферментации оставшийся (геми)целлюлозный материал превращается в восстанавливающие сахара ферментами, уже присутствующими с этапа гидролиза, в то время как продуцируется микробная биомасса и этанол. Ферментацию заканчивают, как только (геми)целлюлозный материал превращается в ферментируемые сахара, а все ферментируемые сахара превращаются в этанол, диоксид углерода и микробные клетки. Это может занимать до 6 дней. В целом, общее время процесса гидролиза и ферментации может составлять до 13 дней.

Полученный таким способом ферментированный затор состоит из неферментируемых сахаров, негидролизованного (геми)целлюлозного материала, лигнина, микробных клеток (чаще всего дрожжевых клеток), воды, этанола, растворенного диоксида углерода. Во время последующих этапов этанол отделяют дистилляцией от затора и подвергают дополнительной очистке. Оставшуюся твердую суспензию сушат и применяют, например, в качестве горючей смеси, фертилизатора или корма для крупного рогатого скота.

WO 2010/080407 предлагает обработку целлюлозного материала целлюлазной

композицией в анаэробных условиях. Удаление или исключение активных форм кислорода может улучшать производительность системы ферментов, гидролизующих целлюлозу. Гидролиз целлюлозного материала, например, лигноцеллюлозы ферментной композицией может снижаться из-за окислительного повреждения компонентов ферментной композиции и/или окисления целлюлозного материала, например, молекулярным кислородом.

WO 2009/046538 раскрывает способ обработки лигноцеллюлозных сырьевых растительных материалов для высвобождения ферментируемых сахаров с применением способа ферментативного гидролиза для обработки материалов, выполняемого под вакуумом, и производящего богатый сахаром технологический поток, включающий сниженные количества летучих соединений, ингибирующих ферментацию сахаров, таких как фурфураль и уксусная кислота. Помимо удаления летучих ингибирующих соединений, другие удаляемые соединения и/или молекулы включают азот, кислород, аргон и диоксид углерода.

С каждой загрузкой сырьевого материала добавляют ферменты для максимизации выхода и скорости высвобождения ферментируемых сахаров из предварительно обработанного лигноцеллюлозного сырьевого материала в определенное время процесса. В целом затраты на продукцию ферментов, сырьевой материал и выход этанола и капиталовложения являются основными факторами стоимости в общих затратах на производство (Kumar, S. Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526). К настоящему времени снижение применения ферментов достигается путем использования ферментных продуктов из одного или из множества микробных источников (WO 2008/008793) с более широкой и/или высокой (удельной) гидролитической активностью, чье применение нацелено на снижение потребности в ферментах, более высокие скорости превращения и/или более высокий выход превращения, и таким образом, на общее снижение затрат на производство биоэтанола. Это требует больших инвестиций в исследования и разработку этих ферментных продуктов. В случае, когда ферментный продукт состоит из ферментов из множества микробных источников, требуются большие инвестиции для получения каждого единственного ферментного соединения.

Таким образом, необходимо улучшить вышеуказанный способ, включающий гидролиз и ферментацию.

Изложение сущности изобретения

Таким образом, задачей настоящего изобретения является обеспечение способа, в котором этап гидролиза проводят в усовершенствованных условиях. Другой задачей изобретения является обеспечение способа, включающего гидролиз со сниженным

временем процесса. Другой задачей изобретения является обеспечение способа, где дозировка фермента может быть уменьшена, а при этом выход полезного продукта гидролиза поддерживается на том же самом уровне или даже повышается. Другой задачей является обеспечение способа, включающего гидролиз, где условия процесса гидролиза являются оптимизированными. Еще одной задачей изобретения является обеспечение способа, включающего гидролиз, где выход полезного продукта гидролиза повышается при использовании той же самой дозировки фермента. Одна или несколько из этих задач решаются в соответствии с изобретением.

Настоящее изобретение обеспечивает способ приготовления сахарного продукта из лигноцеллюлозного материала, включающий следующие этапы:

- (a) необязательно, предварительной обработки лигноцеллюлозного материала;
- (b) необязательно, промывания необязательно подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала;
- (c) ферментативного гидролиза необязательно промытого и/или необязательно подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала в гидролитическом реакторе с применением ферментной композиции, включающей по меньшей мере две целлюлазы; и при этом ферментная композиция по меньшей мере содержит ЛПМО, и

- (d) необязательно, извлечения глюкозо-содержащей композиции;

где количество образованной глюконовой кислоты в конце ферментативного гидролиза путем окисления ЛПМО лигноцеллюлозного материала, содержащего целлюлозу и/или целлоолигосахариды, поддерживают от 3 до 80 г/кг глюкоана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, путем добавления подходящего количества кислорода после предварительной обработки и до и/или во время ферментативного гидролиза лигноцеллюлозного материала.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ приготовления продукта ферментации из лигноцеллюлозного материала, включающий следующие этапы:

- (a) необязательно, предварительной обработки лигноцеллюлозного материала;
- (b) необязательно, промывания необязательно подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала;
- (c) ферментативного гидролиза необязательно промытого и/или необязательно подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала с применением ферментной композиции, включающей по меньшей мере две целлюлазы, и при этом ферментная композиция по меньшей мере содержит ЛПМО, и необязательно очистки гидролизованного лигноцеллюлозного материала,

(d) ферментации гидролизованного лигноцеллюлозного материала для получения продукта ферментации; и

(e) необязательно, извлечения продукта ферментации;

где количество образованной глюконовой кислоты в конце ферментативного гидролиза путем окисления ЛПМО лигноцеллюлозного материала, содержащего целлюлозу и/или целлоолигосахариды, поддерживают от 3 до 80 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, путем добавления подходящего количества кислорода после предварительной обработки и до и/или во время ферментативного гидролиза лигноцеллюлозного материала.

Окисление лигноцеллюлозного материала посредством ЛПМО приводит к окисленным полисахаридам, которые при гидролизе гидролизуются, среди прочего, в глюкозу и окисленные глюкозные единицы, такие как глюконовая кислота или диол. Как правило, 1 молекула кислорода (O_2) дает один моль продукта окисления. Кислород может также потребляться сырьевым материалом (например, лигнином).

Предпочтительно, кислород добавляют во время этапа ферментативного гидролиза (с).

В предпочтительном варианте осуществления кислород добавляют в форме (газовых) пузырьков.

Неожиданно, в соответствии с настоящим изобретением, путем добавления кислорода можно достичь многих преимуществ способа, включая оптимальные температурные условия, снижение времени процесса, снижение дозировки фермента, повторное применение ферментов, высокий выход и другие усовершенствования процесса, что приводит к снижению затрат.

В одном варианте осуществления этого способа время ферментации составляет от 5 до 120 часов. В одном варианте осуществления стабильная ферментная композиция сохраняет активность в течение 30 часов или больше. В соответствии с другим вариантом осуществления, гидролиз предпочтительно проводят при температуре 45°C или больше, более предпочтительно при температуре 50°C или больше, и еще более предпочтительно при температуре 55°C или больше. В предпочтительном варианте осуществления ферментная композиция получена из грибов, предпочтительно из микроорганизма из рода *Rasamsonia*, или ферментная композиция включает грибковый фермент, предпочтительно фермент *Rasamsonia*. Способ из изобретения более подробно иллюстрирован ниже.

Подробное описание изобретения

На протяжении описания и формулы изобретения слова «содержать» и «включать»

и их варианты, такие как «содержит», «содержащий», «включает» и «включающий» должны интерпретироваться как включающие. То есть, эти слова предназначены для выражения возможного включения других элементов или целых чисел, не перечисленных специально, где это следует из контекста. Термины единственного числа предназначены для обозначения одного или более чем одного (т.е. одного или по меньшей мере одного) грамматического объекта статьи. В качестве примера, «элемент» может означать один элемент или более одного элемента.

В контексте настоящего изобретения термины «усовершенствованный», «повышенный», «сниженный» применяются для указания, что настоящее изобретение демонстрирует преимущество по сравнению с той же самой ситуацией, процессом или условиями процесса, за исключением отсутствия добавления лишнего кислорода. В контексте настоящего изобретения «измеренный в тех же самых условиях» или «анализированный в тех же самых условиях» и т.д. означает, что способ из настоящего изобретения и тот же самый способ без добавления кислорода проводят в тех же самых условиях (за исключением добавления кислорода), и что результаты представленного способа, по сравнению со способом без добавления кислорода, измеряют в тех же самых условиях, предпочтительно с применением одного и того же анализа и/или методологии, более предпочтительно, в одном и том же или в параллельном эксперименте. Условия гидролиза являются, например, такими условиями.

В предшествующем уровне техники предлагается улучшение гидролиза целлюлолитического материала с применением анаэробных (WO 2010/080407) или вакуумных (WO 2009/046538) условий во время ферментативного гидролиза. В способах из обоих документов уровень кислорода снижали. Было неожиданно установлено, что гидролиз из настоящего изобретения показывает результаты усовершенствования продукта реакции, который дает более высокие количества (восстанавливающих) сахарных продуктов и/или необходимых продуктов ферментации в ферментации после гидролиза, по сравнению со способом, в котором не добавляют кислорода. В целом, повышение превращения глюкозы составляет от 5 до 15 масс.%.

Кислород можно добавлять несколькими способами. Например, кислород может быть добавлен в виде газообразного кислорода, обогащенного кислородом газа, такого как обогащенный кислородом воздух, или воздуха. Кислород можно добавлять непрерывно или периодически. «Добавление» кислорода означает, что кислород добавляют в жидкую фазу (содержащую лигноцеллюлозный материал) в гидролитический реактор, а не то, что кислород присутствует в свободном пространстве реактора над жидкой фазой, где кислород должен диффундировать из свободного пространства в жидкую фазу.

Предпочтительно, кислород добавляют или генерируют в жидкой фазе (содержащей лигноцеллюлозный материал) в гидролитическом реакторе. Более предпочтительно, кислород добавляют в виде пузырьков, наиболее предпочтительно, маленьких пузырьков. В одном варианте осуществления пузырьки имеют диаметр по меньшей мере 0,5 мм, по меньшей мере 1 мм, по меньшей мере 1,5 мм, по меньшей мере 2 мм, по меньшей мере 2,5 мм, по меньшей мере 3 мм, по меньшей мере 3,5 мм, по меньшей мере 4 мм, по меньшей мере 4,5 мм, по меньшей мере 5 мм. В одном варианте осуществления пузырьки имеют диаметр от 0,5 мм до 500 мм, предпочтительно от 0,5 до 400 мм, от 0,5 до 300 мм, от 0,5 до 200 мм, от 0,5 до 100 мм. Авторы изобретения выдвинули гипотезу, что на этапе (ферментативного) гидролиза аморфные полисахариды гидролизуются до сахаров, таких как глюкоза. Аморфные полисахариды, например, превращаются в олигосахариды эндоглюконазами, при этом впоследствии олигосахариды могут превращаться целлобиогидролазой (ЦБГ) и бета-глюкозидазой (БГ) в глюкозу. Превращение кристаллических полисахаридов может происходить параллельно или последовательно, и продолжаться даже когда большинство аморфных полисахаридов гидролизуются. В соответствии с представленной гипотезой, в особенности добавление кислорода в комбинации с ЛПМО благоприятно при гидролизе кристаллических полисахаридов, например, при деградации полисахаридов в олигосахариды. Таким образом, добавление кислорода очень полезно, особенно в фазе, когда кристаллические полисахариды превращаются ферментами. Вне этой фазы отсутствие добавления кислорода или добавление меньшего количества кислорода может быть более эффективным. Эта гипотеза является единственной, дающей возможное объяснение эффекта, отмечаемого авторами изобретения, и настоящее изобретение не опровергает и не оспаривает правильность этого предположения.

Кристаллическая структура глюканов может быть открыта литической полисахарид-монооксигеназой (ЛПМО). Этот тип фермента открывает структуру путем окисления гликозидных связей и обеспечения их доступности для других целлюлолитических ферментов для последующего гидролиза олигосахаридов в глюкозу.

Большинство известных ЛПМО образуют альдоновые кислоты, т.е. продукты, окисленные в C1 положении терминального сахара в участке расщепления. Эта окисленная глюкозная единица высвобождается в виде глюконовой кислоты при гидролизе. Кроме того, отмечено окисление C4 и C6 невозстанавливающей глюкозной единицы в участке расщепления. Например, T. Isaksen et. al. (выше) сообщали об окислении C4 положения невозстанавливающего концевого компонента, приводящем к образованию кетосахара в C4 положении, который находится в равновесии с

присоединенным к тому же атому С4 диолом в водном растворе. Авторы настоящего изобретения предположили, что гидролизованные продукты окисления, например, такие как глюконовая кислота, являются мерой активности применяемой ЛПМО в гидролизе лигноцеллюлозы.

Авторы настоящего изобретения неожиданно установили, что оптимальный гидролиз лигноцеллюлозы (превращение более 70% глюканов) связан с оптимальным образованием продуктов окисления, упомянутых выше, например, таких как глюконовая кислота. Очевидно, что оптимальный гидролиз лигноцеллюлозы может достигаться только тогда, когда (кристаллическая) целлюлоза и целлолигосахариды оптимально гидролизуются. Оптимальный гидролиз под действием ЛПМО приводит к образованию продукта окисления, такого как глюконовая кислота. Отсутствие продукта окисления означает менее эффективный гидролиз (кристаллического) глюкана. Однако слишком высокие уровни продуктов окисления, таких как глюконовая кислота, происходят при расходе глюкозы, и таким образом, выход глюкозы по (исходному) глюкану снижается. Количество образованных продуктов окисления при окислении ЛПМО целлюлозы и/или целлолигосахаридов предпочтительно сохраняется от 3 до 110 г/кг глюкана присутствующего в лигноцеллюлозном материале, путем добавления подходящего количества кислорода после предварительной обработки и до и/или во время ферментативного гидролиза в лигноцеллюлозный материал. Предпочтительно, продуктом окисления является альдоновая кислота и/или геминальный диол, более предпочтительно, гидролизованным продуктом окисления является глюконовая кислота. Предпочтительно, количество образованных гидролизованных продуктов окисления при окислении целлюлозы и/или целлолигосахаридов поддерживается от 4 до 8 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, более предпочтительно от 5 до 60 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, еще более предпочтительно от 6 до 40 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, еще более предпочтительно от 7 до 30 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале и наиболее предпочтительно от 8 до 25 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале. В другом варианте осуществления количество образованной глюконовой кислоты при окислении целлюлозы и/или целлолигосахаридов поддерживается от 3 до 110 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, предпочтительно от 3 до 80 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, предпочтительно от 3 до 75 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, предпочтительно от 3 до 70 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, предпочтительно от 3 до 65

г/кг глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, предпочтительно от 3 до 60 г/кг глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, предпочтительно от 3 до 50 г/кг глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, предпочтительно от 4 до 50 г/кг глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, более предпочтительно от 4 до 30 г/кг глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, еще более предпочтительно от 4 до 20 г/кг глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, и наиболее предпочтительно от 5 до 10 г/кг глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале.

С помощью способа из настоящего изобретения предпочтительно получают более высокие выходы глюкозы. Добавление более высоких количеств кислорода приводит к большему образованию глюконовой кислоты вместо глюкозы, а с другой стороны, в случае низких количеств кислорода ЛПМО неспособна оптимально функционировать. Далее, отмечалось, что слишком высокие количества продуктов окисления, таких как глюконовая кислота, могут ингибировать целлюлазы или гемицеллюлазы, или в случае последующей ферментации гидролизата, глюконовая кислота может оказывать отрицательное влияние на ферментацию путем ингибирования микроорганизма, такого как дрожжи, используемого при ферментации. Вышеуказанные количества являются количествами в конце гидролиза.

Как правило, количество кислорода, добавляемого после предварительной обработки и до и/или во время ферментативного гидролиза в лигноцеллюлозный материал, можно контролировать или менять различными способами. Ограничение подачи кислорода возможно путем добавления кислорода только во время части времени гидролиза. Другим вариантом является добавление кислорода в низкой концентрации, например, с помощью смеси воздуха и рециркулирующего воздуха (воздуха, выходящего из гидролитического реактора) или путем «разбавления» воздуха инертным газом. Повышение количества добавляемого кислорода может быть достигнуто путем добавления кислорода в течение более продолжительного времени гидролиза, путем добавления кислорода в более высокой концентрации, или путем добавления большего количества воздуха. Другим вариантом изменения потребления кислорода является изменение температуры гидролиза, более высокая температура вызывает снижением максимальной концентрации насыщения кислорода в содержимом реактора. Другим способом контроля концентрации кислорода является добавление потребителя кислорода или генератора кислорода. В случае, если фермент может повреждаться при наличии или при добавлении кислорода, можно применять более умеренную подачу кислорода. В этом случае может быть найден баланс между улучшенной выработкой глюкозы и

производительностью фермента. Добавление кислорода в целлюлолитический материал можно проводить до и/или во время ферментативного гидролиза. В случае добавления кислорода в газообразной форме, кислородсодержащий газ можно вводить, например, вдувать, в жидкое содержимое гидролитического реактора из целлюлолитического материала. В другом варианте осуществления изобретения кислородсодержащий газ вводят в жидкий поток целлюлолитического материала, который поступает в гидролитический реактор. В другом варианте осуществления изобретения кислородсодержащий газ вводят вместе с целлюлолитическим материалом, который поступает в гидролитический реактор, или с частью жидкого содержимого реактора, которое проходит внешнюю петлю реактора. В большинстве случаев добавление кислорода до поступления в гидролитический реактор не является достаточным, и добавление кислорода можно осуществлять также во время гидролиза. В другом варианте осуществления изобретения газовую фазу, присутствующую в верхней части реактора (свободном пространстве), непрерывно или периодически обновляют кислородсодержащим газом. В последнем случае необходимо (активное) взбалтывание или перемешивание для прохода кислорода в виде пузырьков и/или посредством диффузии в жидкое содержимое реактора, предпочтительно в комбинации с избыточным давлением в реакторе. В целом, продувание свободного пространства воздухом в комбинации с (активным) взбалтыванием или перемешиванием может обеспечивать достаточное введение кислорода в целлюлолитический материал в гидролитическом реакторе для реакторов размером от 100 литров до 1 м³. При большем масштабе, например, в реакторе 50 м³ или больше, например, 100 м³, требуется так много энергии для активного перемешивания, что с экономической точки зрения это неприменимо в коммерческих операционных процессах.

Как описано в настоящей заявке, количество образованной глюконовой кислоты в конце ферментативного гидролиза посредством ЛПМО лигноцеллюлозного материала, содержащего целлюлозу и/или целлоолигосахариды, сохраняют от 3 до 80 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, путем добавления подходящего количества кислорода после предварительной обработки до и/или во время ферментативного гидролиза к лигноцеллюлозному материалу. В одном варианте осуществления «подходящее количество кислорода составляет 20-10,000 ммоль кислорода на килограмм глюкана, предпочтительно 30-5,000 ммоль кислорода на килограмм глюкана, более предпочтительно 40 – 4,000 ммоль кислорода на килограмм глюкана и наиболее предпочтительно 50–3,500 ммоль кислорода на килограмм глюкана. Количество кислорода является полным количеством кислорода, добавленного при ферментативном

гидролизе.

В соответствии с настоящим изобретением, кислород может быть добавлен перед этапом гидролиза, во время части этапа гидролиза, во время всего этапа гидролиза, или комбинации до или во время этапа гидролиза. Предпочтительно, кислород добавляют во время первой половины этапа гидролиза. Добавление кислорода во время только части гидролиза можно проводить, например, в случае, если происходит окислительное повреждение фермента(ов). В случае присутствия кислорода в гидролитическом реакторе содержание сахарного продукта или гидролизата, образованного на этапе гидролиза, может влиять или нарушать последующий этап ферментации, и добавление кислорода можно проводить за исключением последней части гидролиза, и таким образом, кислород (большая часть) потребляется до поступления гидролизованной биомассы в реактор для ферментации.

Некоторые примеры аэрирования во время процесса ферментативного гидролиза приведены в Примерах для демонстрации благоприятного эффекта настоящего изобретения. Этот благоприятный эффект выявлен для некоторых субстратов или сырьевых материалов, и таким образом, как считается, присутствует при гидролизе всех видов субстратов или сырьевых материалов.

Некоторые примеры ферментных композиций для процесса ферментативного гидролиза приведены в Примерах для демонстрации полезного эффекта настоящего изобретения. Этот полезный эффект был установлен для некоторых ферментных композиций, и таким образом, признан присутствующим для всех видов гидролизующих ферментных композиций.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения концентрация кислорода (РК) в жидкой фазе, где присутствует лигноцеллюлозный материал во время ферментативного гидролиза, составляет по меньшей мере $0,001$ моль/м³, предпочтительно по меньшей мере $0,002$ моль/м³, более предпочтительно по меньшей мере $0,003$ моль/м³ и еще более предпочтительно больше $0,01$ моль/м³, например, больше $0,02$ моль/м³ или $0,03$ моль/м³. В реакторах объемом меньше 1 м³ значения РК ниже $0,01$ моль/м³ или $0,02$ моль/м³ достигаются путем медленного перемешивания. Интенсивное перемешивание или взбалтывание в таком масштабе вводит часть газовой фазы из свободного пространства в реакционную жидкость. Например, перемешивание или взбалтывание может создать воронку, вводящую кислород в жидкость. В целом, продувка свободного пространства воздухом в комбинации с (интенсивным) перемешиванием или взбалтыванием обеспечивает введение достаточного количества кислорода в целлюлозный материал в гидролитическом реакторе для реакторов размером от 100 литров до 1 м³. В большем

объеме, например, в реакторе объемом 50 м^3 или больше, например, 100 м^3 , требуется так много энергии для интенсивного перемешивания, что с экономической точки зрения это неприменимо в коммерческом операционном процессе. В целом, в больших реакторах перемешивание или взбалтывание без введения воздуха или кислорода приводит к значениям РК меньше $0,01 \text{ моль/м}^3$.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения при генерации или продукции кислорода концентрация кислорода в жидкой фазе (аэрирование или добавление кислорода), где присутствует лигноцеллюлозный материал во время ферментативного гидролиза, составляет предпочтительно самое большее 80% от концентрации насыщения кислорода в условиях реакции гидролиза, более предпочтительно самое большее $0,12 \text{ моль/м}^3$, еще более предпочтительно самое большее $0,09 \text{ моль/м}^3$, еще более предпочтительно самое большее $0,06 \text{ моль/м}^3$, еще более предпочтительно самое большее $0,045 \text{ моль/м}^3$ и наиболее предпочтительно самое большее $0,03 \text{ моль/м}^3$. Вышеуказанное учитывает ситуацию, когда скорость переноса кислорода из лигноцеллюлозного материала превышает скорость потребления кислорода (СПК) лигноцеллюлозного материала. Когда потребление кислорода (СПК) превышает скорость переноса кислорода, концентрация кислорода составляет 0 моль/м^3 . Температура и давление оказывают влияние на РК. Предпочтительные и примерные значения в моль/м^3 , приведенные выше, относятся к нормальному атмосферному давлению и температуре около 62°C . Специалист в данной области техники сможет подобрать подходящие значения РК на основе представленных учений.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления изобретения, кислород потребляется в количестве, соответствующем от 20 до 5000 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале. Предпочтительно, кислород потребляется в количестве, соответствующем от 22 до 4500 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, от 24 до 4000 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, от 26 до 3500 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, от 28 до 3400 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале. Кислород добавляют после предварительной обработки и до и/или во время ферментативного гидролиза лигноцеллюлозного материала, предпочтительно, в количестве, соответствующем по меньшей мере 30 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, более предпочтительно в

количестве, соответствующем по меньшей мере 40 ммоль молекулярного кислорода на кг глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, и наиболее предпочтительно в количестве, соответствующем по меньшей мере 50 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале. Весь кислород, который добавляют в систему, переносится в жидкость и используется для гидролиза. Это количество можно контролировать путем измерения и контроля количества воздуха, приносимого в систему.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления изобретения, кислород потребляется в количестве, соответствующем от 0,17 до 41,7 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, в час. Предпочтительно, кислород потребляется в количестве, соответствующем от 0,18 до 37,5 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, в час, от 0,20 до 33,3 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, в час, от 0,22 до 29,2 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, в час, от 0,23 до 28,3 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, в час. Более предпочтительно, кислород потребляется в количестве, соответствующем от 0,36 до 27,8 ммоль молекулярного кислорода на килограмм глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, в час. Весь кислород, добавляемый в систему, переносится в жидкость и применяется для гидролиза. Это количество можно контролировать путем измерения и контроля количества воздуха, вносимого в систему. «В час», как применяется в настоящей заявке, означает в час гидролиза.

Добавление кислорода в форме воздуха или другого кислородсодержащего газа в соответствии с настоящим изобретением можно также применять для по меньшей мере частичного взбалтывания или перемешивания содержимого гидролитического реактора. Другие способы добавления кислорода включают генерацию кислорода *in situ*. Например, кислород генерируют путем электролиза, кислород продуцируют ферментативно, предпочтительно путем добавления перекиси, или кислород продуцируют химическим путем, например, посредством систем, генерирующих кислород, таких как KHSO_5 . Например, кислород продуцируется из перекиси каталазой. Перекись можно добавлять в форме растворенной перекиси, или генерировать путем ферментативной или химической реакции. В случае, когда каталазу применяют в качестве фермента для продукции кислорода, можно применять каталазу, присутствующую в ферментной композиции для

гидролиза, или каталазу можно добавлять для этой цели.

Представленный способ из настоящего изобретения демонстрирует преимущества, особенно в пилотном масштабе и промышленном масштабе. В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения, реактор для ферментативного гидролиза имеет объем 1 м^3 или больше. Предпочтительно, реактор имеет объем по меньшей мере 1 м^3 , по меньшей мере 2 м^3 , по меньшей мере 3 м^3 , по меньшей мере 4 м^3 , по меньшей мере 5 м^3 , по меньшей мере 6 м^3 , по меньшей мере 7 м^3 , по меньшей мере 8 м^3 , по меньшей мере 9 м^3 , по меньшей мере 10 м^3 , по меньшей мере 15 м^3 , по меньшей мере 20 м^3 , по меньшей мере 25 м^3 , по меньшей мере 30 м^3 , по меньшей мере 35 м^3 , по меньшей мере 40 м^3 , по меньшей мере 45 м^3 , по меньшей мере 50 м^3 , по меньшей мере 60 м^3 , по меньшей мере 70 м^3 , по меньшей мере 75 м^3 , по меньшей мере 80 м^3 , по меньшей мере 90 м^3 , по меньшей мере 100 м^3 , по меньшей мере 200 м^3 , по меньшей мере 300 м^3 , по меньшей мере 400 м^3 , по меньшей мере 500 м^3 , по меньшей мере 600 м^3 , по меньшей мере 700 м^3 , по меньшей мере 800 м^3 , по меньшей мере 900 м^3 , по меньшей мере 1000 м^3 , по меньшей мере 1500 м^3 , по меньшей мере 2000 м^3 , по меньшей мере 2500 м^3 . В целом, реактор должен быть меньше 3000 м^3 или 5000 м^3 . Можно использовать несколько реакторов. Реакторы, используемые в способах из настоящего изобретения, могут иметь один и тот же объем, но также могут иметь различные объемы.

Автор настоящего изобретения предположил, что особенно при крупномасштабном производстве недостаточно кислорода, доступного для гидролиза, что может быть обусловлено ограничениями переноса кислорода в реакторе, например, в целлюлолитической биомассе. В экспериментах в лабораторном масштабе эта недостаточность кислорода может играть менее важную роль. Отношение поверхностной площади (или площади контакта с кислородом содержимого реактора) к объему реактора является более благоприятным для экспериментов в маленьком масштабе, чем для крупномасштабных экспериментов. Далее, перемешивание в экспериментах в маленьком масштабе относительно легче перемешивания в крупном масштабе. Во время этих экспериментов в маленьком масштабе также быстрее происходит транспорт кислорода из свободного пространства гидролитического реактора, по сравнению с крупномасштабными экспериментами. Эта теория является единственной, дающей возможное объяснение эффекту, отмеченному авторами настоящего изобретения, и настоящее изобретение не опровергает и не оспаривает правильность этой теории. В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения, добавление кислорода можно применять для по меньшей мере частичного контроля процесса гидролиза.

Способ из настоящего изобретения предпочтительно применяют в комбинации с

использованием термостабильных ферментов.

«Термостабильный» фермент означает фермент, имеющий температурный оптимум 60°C или выше, например, 70°C или выше, такой как 75°C или выше, например, 80°C или выше, такой как 85°C или выше. Он может быть, например, выделен из термофильных микроорганизмов, или может быть сконструирован специалистом в данной области техники и искусственно синтезирован. В одном варианте осуществления полинуклеотиды могут быть выделены или получены из термофильных или термотолерантных мицелиальных грибов, или выделены из нетермофильных или нетермотолерантных грибов, но являются термостабильными.

«Термофильный грибок» означает грибок, растущий при температуре 50°C или выше. «Термотолерантный» грибок означает грибок, растущий при температуре 45°C или выше, имеющий максимум около 50°C.

Примерами термофильных грибковых штаммов являются *Rasamsonia emersonii* (ранее известный как *Talaromyces emersonii*; *Talaromyces emersonii*, *Penicillium geosmithia emersonii* и *Rasamsonia emersonii* применяются взаимозаменяемо в настоящей заявке).

Подходящими термофильными или термотолерантными грибковыми клетками могут быть клетки *Humicola*, *Rhizomucor*, *Myceliophthora*, *Rasamsonia*, *Talaromyces*, *Thermomyces*, *Thermoascus* или *Thielavia*, предпочтительно клетки *Rasamsonia emersonii*. Предпочтительными термофильными или термотолерантными грибами являются *Humicola grisea* var. *thermoidea*, *Humicola lanuginosa*, *Myceliophthora thermophila*, *Papulaspora thermophila*, *Rasamsonia byssochlamydoides*, *Rasamsonia emersonii*, *Rasamsonia argillacea*, *Rasamsonia eburnean*, *Rasamsonia brevistipitata*, *Rasamsonia cylindrospora*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei*, *Talaromyces bacillisporus*, *Talaromyces leycettanus*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermomyces lenuginosus*, *Thermoascus crustaceus*, *Thermoascus thermophilus* *Thermoascus aurantiacus* и *Thielavia terrestris*.

Термофильные грибки не ограничиваются специфическим таксономическим порядком, и все относятся к грибковой ветви эволюции. Примерами являются *Rhizomucor* в мукоровых грибах, *Myceliophthora* в сордариевых грибах, и *Talaromyces*, *Thermomyces* и *Thermoascus* в эуроциевых грибах (Mouchacca 1997). Большинство видов *Talaromyces* являются мезофиллами, но исключением являются виды в группах *Emersonii* и *Thermophila*. Группа *Emersonii* включает *Talaromyces emersonii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces bacillisporus* и *Talaromyces leycettanus*, все из которых хорошо растут при 40°C. *Talaromyces bacillisporus* является термотолерантным, *T. leycettanus* является термотолерантным или термофильным, а *T. emersonii* и *T. byssochlamydoides* являются истинно термофильными (Stolk and Samson 1972).

Единственный представитель группы *Talaromyces Thermophila*, *T. thermophilus*, быстро растет при 50°C (Evans and Stolk 1971; Evans 1971; Stolk and Samson 1972). Текущая классификация этих термофильных видов *Talaromyces* основана главным образом на фенотипических и физиологических характеристиках, таких как их способность к росту при температуре выше 40°C, окраска аскоспор, структура оболочки аска, и образование определенного типа анаморфа. Stolk and Samson (1972) установили, что члены группы *Emersonii* имеют анаморфы серий либо *Paecilomyces* (*T. byssochlamydoides* и *T. leucettanus*), либо *Penicillium cylindrosporum* (*T. emersonii* и *T. bacillisporus*). Позднее Pitt (1979) перенес виды, принадлежащие к виду *Penicillium cylindrosporum*, в род *Geosmithia*, на основании различных признаков, таких как образование конидий из терминальных пор вместо шейки, признака *Penicillium* и *Paecilomyces*. Из рода *Geosmithia*, только *G. argillacea* является термотолерантным, и Stolk et al. (1969) и Evans (1971) предположили связь с членами группы *Talaromyces Emersonii*. Филогенетическая связь термофильных видов *Talaromyces* в пределах *Talaromyces* и *Trichosomaceae* неизвестна (см. J. Houbraken, Antonie van Leeuwenhoek 2012 Feb; 101(2): 403-21).

Rasamsonia является новым родом, содержащим термотолерантные и термофильные виды *Talaromyces* и *Geosmithia* (J. Houbraken et al, выше). На основе фенотипических, физиологических и молекулярных данных, Houbraken et al предложили перенести виды *T. emersonii*, *T. byssochlamydoides*, *T. eburneus*, *G. argillacea* и *G. cylindrospora* в род *Rasamsonia*. *Talaromyces emersonii*, *Penicillium geosmithia emersonii* и *Rasamsonia emersonii* применяются взаимозаменяемо в настоящей заявке.

Предпочтительными термофильными грибами являются *Rasamsonia byssochlamydoides*, *Rasamsonia emersonii*, *Thermomyces leniginosus*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermoascus crustaceus*, *Thermoascus thermophilus* и *Thermoascus aurantiacus*.

«Мицелиальные грибки» включают все филламентные формы подотдела *Eumycota* и *Oomycota* (как определено Hawksworth et al., в «Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK («Справочник грибов Бисби»)). Мицелиальные грибки характеризуются мицелиальной стенкой, состоящей из хитина, целлюлозы, глюкана, хитозана, маннана, и других комплексных полисахаридов. Вегетативный рост осуществляется за счет гифального удлинения, а метаболизм углерода является облигатно аэробным. Штаммы мицелиальных грибов включают *Acremonium*, *Agaricus*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Cephalosporium*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomium paecilomyces*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochiobolus*, *Coprinus*, *Cryptococcus*, *Cyathus*, *Emericella*, *Endothia*, *Endothia mucor*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Geosmithia*, *Gilocladium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Myrothecium*,

Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Piromyces, Panerochaete, Pleurotus, Podospora, Pyricularia, Rasamsonia, Rhizomucor, Rhizopus, Scylatidium, Schizophyllum, Stagonospora, Talaromyces, Thermoascus, Thermomyces, Thielavia, Tolypocladium, Trametes pleurotus, Trichoderma и Trichophyton, но не ограничиваются ими.

Некоторые штаммы мицелиальных грибов легко доступны по номеру коллекций культур, таких как Американская коллекция типовых культур (АТСС), Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур (DSM), Центральное бюро грибковых культур (СБС), и Коллекция патентованных культур Службы сельскохозяйственных исследований, Северный региональный исследовательский центр (NRRL). Примеры таких штаммов включают *Aspergillus niger* CBS 513,88, *Aspergillus oryzae* ATCC 20423, IFO 4177, ATCC 1011, ATCC 9576, ATCC14488-14491, ATCC 11601, ATCC12892, *P. chrysogenum* CBS 455,95, *Penicillium citrinum* ATCC 38065, *Penicillium chrysogenum* P2, *Talaromyces emersonii* CBS 393,64, *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 или ATCC 48272, *Trichoderma reesei* ATCC 26921 или ATCC 56765 или ATCC 26921, *Aspergillus sojae* ATCC11906, *Chrysosporium lucknowense* C1, Garg 27K, VKM F-3500-D, ATCC44006 и их производные.

Преимуществом экспрессии и выработки ферментов (например, по меньшей мере двух, трех или четырех различных целлюлаз) в подходящем микроорганизме может быть высокий выход ферментной композиции, которую можно применять в способе из настоящего изобретения.

В соответствии с изобретением, путем добавления кислорода можно достичь многих преимуществ способа, включая оптимальные температурные условия, снижение времени процесса, снижение дозировки фермента повторное применение ферментов и другие оптимизации процесса, что приводит к снижению затрат. Предпочтительно, изобретение обеспечивает способ, в котором этап гидролиза осуществляют при усовершенствованных условиях. Изобретение также обеспечивает способ, включающий гидролиз, имеющий сниженное время процесса. Далее, изобретение обеспечивает способ, где дозировка фермента может быть снижена, и в то же самое время выход полезного продукта гидролиза остается на том же самом уровне. Другим преимуществом изобретения является то, что представленный способ, включающий гидролиз, может приводить к оптимизированным условиям процесса. Другим преимуществом изобретения является то, что выход полезного продукта способа, включающего гидролиз, повышается при той же самой дозировке фермента.

Стабильная ферментная композиция

Стабильная ферментная композиция означает в настоящей заявке, что ферментная

композиция сохраняет активность спустя 30 часов реакции гидролиза, предпочтительно по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% от исходной активности спустя 30 часов реакции гидролиза. Предпочтительно, ферментная композиция сохраняет активность спустя 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 часов реакции гидролиза.

В одном варианте осуществления ферментная композиция, используемая в способах из настоящего изобретения, получена из грибков, либо ферментная композиция, используемая в способах из настоящего изобретения, содержит фермент грибка. В одном варианте осуществления ферментная композиция получена из мицелиального грибка, или ферментная композиция содержит фермент мицелиального грибка. Способы из изобретения предпочтительно применяют в комбинации с ферментными композициями, полученными из микроорганизма из рода *Rasamsonia*, или ферментная композиция содержит фермент из *Rasamsonia*.

Ферментная композиция может быть приготовлена путем ферментации подходящего субстрата с подходящим микроорганизмом, например, *Rasamsonia emersonii* или *Aspergillus niger*, где ферментная композиция вырабатывается микроорганизмом. Микроорганизм может быть изменен для улучшения или получения целлюлазной композиции. Например, микроорганизм может быть подвергнут мутации посредством классических процедур улучшения штамма или путем методик рекомбинантной ДНК. Таким образом, микроорганизм, упомянутый в настоящей заявке, можно применять как таковой для получения целлюлазной композиции, или он может быть изменен для повышения продукции или для выработки измененной целлюлазной композиции, которая может включать гетерологичные целлюлазы, такие ферменты, которые не являются исходно продуцируемыми этим микроорганизмом. Предпочтительно грибок, более предпочтительно мицелиальный грибок применяют для получения целлюлазной композиции. Предпочтительно применяют термофильный или термотолерантный микроорганизм. Необязательно, применяют субстрат, который индуцирует экспрессию ферментов в ферментной композиции при получении ферментной композиции.

Ферментную композицию применяют для высвобождения сахаров из лигноцеллюлозы, которая включает полисахариды. Главными полисахаридами являются целлюлоза (глюканы), гемицеллюлозы (ксиланы, гетероксиланы и ксилоглюканы). Кроме того, некоторая гемицеллюлоза может присутствовать в виде глюкоманнанов, например, в сырьевом материале из древесины. Ферментативный гидролиз этих полисахаридов до растворимых сахаров, включая мономеры и мультимеры, например, глюкозу, целлобиозу, ксилозу, арабинозу, галактозу, фруктозу, маннозу, рамнозу, рибозу, галактуроновую

кислоту, глюкуроновую кислоту и другие гексозы и пентозы, осуществляется под действием различных ферментов, действующих согласованно. «Сахарный продукт» означает продукт ферментативного гидролиза сырьевого материала или лигноцеллюлозного материала. Сахарный продукт включает растворимые сахара, в том числе мономеры и мультимеры, предпочтительно включает глюкозу. Примерами других сахаров являются целлобиоза, ксилоза, арабиноза, галактоза, фруктоза, манноза, рамноза, рибоза, галактуроновая кислота, глюкуроновая кислота и другие гексозы и пентозы. Сахарный продукт может применяться как таковой, или может быть подвергнут дополнительной обработке, например, очищен.

Кроме того, пектины и другие пектиновые вещества, такие как арабинаны, могут составлять значительную часть сухой массы стенок типичной клетки из тканей недревесного растения (примерно от четверти до половины сухой массы может быть пектинами).

Целлюлоза является линейным полисахаридом, состоящим из глюкозных остатков, связанных β -1,4 связями. Линейная природа целлюлозных волокон, а также стехиометрия β -сцепленной глюкозы (относительно α) создает структуры, более склонные к связыванию водорода между цепями, чем высоко разветвленные α -сцепленные структуры крахмала. Таким образом, целлюлозные полимеры, как правило, являются менее растворимыми, и образуют более тесно связанные волокна, чем волокна, находящиеся в крахмале.

Ферменты, которые могут быть включены в стабильную ферментную композицию, используемую в настоящем изобретении, далее описаны более подробно.

GN61, эндоглюканазы (ЭГ) и экзоцеллобиогидролазы (ЦБГ) катализируют гидролиз нерастворимой целлюлозы в такие продукты, как целлоолигосахариды (целлобиоза в качестве основного продукта), в то время как бета-глюкозидазы (БГ) превращают олигосахариды, главным образом целлобиозу и целлотриозу, в глюкозу.

Гемицеллюлоза является сложным полимером, и её состав часто широко варьирует от организма к организму, и от одного типа ткани к другому. Как правило, главным компонентом гемицеллюлозы является β -1,4-сцепленная ксилоза, сахар с пятью атомами углерода. Однако эта ксилоза часто разветвлена на 0-3 и/или 0-2 атоме ксилозы, и может быть замещена со связями на арабинозу, галактозу, маннозу, глюкуроновую кислоту, галактуроновую кислоту, или путем этерификации на уксусную кислоту (и этерификацией феруловой кислоты на арабинозу). Гемицеллюлоза может также содержать глюкан, который является общим термином для β -сцепленных сахаров с шестью углеродными атомами (таких как β -(1,3)(1,4) глюканы и гетероглюканы, упомянутые ранее) и кроме того, глюкоманнаны (в которых глюкоза и манноза присутствуют в линейном каркасе,

связываясь с другими β -связями).

Ксиланазы вместе с другими вспомогательными ферментами, например, α -L-арабинофуранозидазами, ферулоил- и ацетилксилан эстеразами, глюкуронидазами и β -ксилозидазами катализируют гидролиз гемицеллюлоз.

Пектиновые вещества включают пектины, арабинаны, галактаны и арабиногалактаны. Пектины являются наиболее сложными полисахаридами в клеточной стенке растений. Они построены вокруг сердцевинной цепи из единиц $\alpha(1,4)$ -сцепленной D-галактуроновой кислоты, до некоторой степени вперемежку с L-рамнозой. В любой клеточной стенке имеется ряд структурных единиц, которые соответствуют этому описанию, и в целом считается, что в отдельной пектиновой молекуле сердцевинные цепи различных структурных единиц являются непрерывными с любыми другими.

Основными типами структурной единицы являются: галактуронан (гомогалактуронан), который может быть замещен с метанолом на карбоксильной группе и ацетатом на O-2 и O-3; рамногалактуронан I (РГI), в котором единицы галактуроновой кислоты чередуются с рамнозными единицами, несущими боковые цепи (1,4)-связанного галактана и (1,5)-связанного арабинана. Арабинановые боковые цепи могут присоединяться непосредственно к рамнозе или опосредованно через галактановые цепи; ксилогалактуронану, с отдельными ксилозильными единицами на O-3 галактуроновой кислоте (тесно связанной с РГI); и рамногалактуронану II (РГII), особо сложной минорной единице, содержащей необычные сахара, например, апиозу. РГIII единица может содержать два апиозильных остатка, которые при подходящих ионных условиях могут обратимо формировать сложные эфиры с боратом.

Композиция для применения в способе из настоящего изобретения имеет по меньшей мере две активности, хотя, как правило, композиция имеет более двух активностей, например, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или больше. Как правило, композиция из настоящего изобретения может содержать по меньшей мере две различных целлюлазы, или одну целлюлазу и по меньшей мере одну гемицеллюлазу. Композиция из настоящего изобретения может содержать целлюлазы, но не ксиланазы. Кроме того, композиция из настоящего изобретения может иметь вспомогательную ферментативную активность, т.е. дополнительную активность, которая напрямую или опосредованно приводит к деградации лигноцеллюлозы. Примеры таких вспомогательных активностей упомянуты в настоящей заявке.

Таким образом, композиция для применения в изобретении может содержать GN61, эндоглюканиазную активность и/или целлобиогидролазную активность и/или бета-глюкозидазную активность. Композиция для применения в изобретении может содержать

более одной ферментативной активности одного или нескольких из этих классов. Например, композиция для применения в настоящем изобретении может содержать две эндоглюканазные активности, например, эндо-1,3(1,4)-β-глюканазную активность и эндо-β-1,4-глюканазную активность. Такая композиция может также включать одну или несколько ксиланазных активностей. Такая композиция может содержать вспомогательную ферментативную активность.

Композиция для применения в настоящем изобретении может быть получена из грибов, таких как мицелиальных грибки, такие как *Rasamsonia*, такие как *Rasamsonia emersonii*. В одном варианте осуществления основной набор (деградирующих целлюлозу) ферментативных активностей может быть получен из *Rasamsonia emersonii*. *Rasamsonia emersonii* может обеспечить высокоэффективный набор активностей, как показано в настоящей заявке, для гидролиза лигноцеллюлозного материала. Если необходимо, к набору активностей может быть добавлены дополнительные ферментативные активности из других источников. Такие дополнительные активности могут быть получены из классических источников и/или обеспечены генетически модифицированными организмами.

Активности в композиции для применения в изобретении могут быть термостабильными. В настоящей заявке это означает, что активность имеет температурный оптимум около 60°C или выше, например, около 70°C или выше, такой как около 75°C или выше, например, около 80°C или выше, такой как 85°C или выше. Активности в композиции для применения в изобретении, как правило, не имеют один и тот же температурный оптимум, но, тем не менее, предпочтительно являются термостабильными.

Кроме того, активности ферментов в композиции для применения в изобретении могут работать при низком pH. Для целей этого изобретения, низкий pH означает pH около 5,5 или ниже, около 5 или ниже, около 4,9 или ниже, около 4,8 или ниже, около 4,7 или ниже, около 4,6 или ниже, около 4,5 или ниже, около 4,4 или ниже, около 4,3 или ниже, около 4,2 или ниже, около 4,1 или ниже, около 4,0 или ниже, около 3,9 или ниже, около 3,8 или ниже, около 3,7 или ниже, около 3,6 или ниже, или около 3,5 или ниже.

Активности для композиции для применения в изобретения могут определяться комбинацией любых из вышеуказанных температурных оптимумов и значений pH.

Композиция, используемая в способе из настоящего изобретения, может включать, в дополнение к активностям, полученным из *Rasamsonia*, целлюлазу (например, полученную из иного источника, чем *Rasamsonia*) и/или гемицеллюлазу (например, полученную из иного источника, чем *Rasamsonia*), и/или пектиназу.

Ферментативная композиция для применения в настоящем изобретении может включать целлюлазу и/или гемицеллюлазу и/или пектиназу из иного источника, чем *Rasamsonia*. Они могут применяться вместе с одним или несколькими ферментами *Rasamsonia*, или они могут применяться без дополнительных ферментов *Rasamsonia*.

Например, ферменты для применения в процессах из настоящего изобретения могут включать бета-глюкозидазу (БГ) из *Aspergillus*, такого как *Aspergillus oryzae*, такую как раскрыто в WO 02/095014, или гибридный белок, обладающий бета-глюкозидазной активностью, раскрытый в WO 2008/057637, или *Aspergillus fumigatus*, такой как раскрыт как SEQ ID NO:2 в WO 2005/047499 или SEQ ID NO:5 в WO 2014/130812, или вариант бета-глюкозидазы *Aspergillus fumigatus*, такой как раскрыт в WO 2012/044915, такой как со следующими заменами: F100D, S283G, N456E, F512Y (с применением SEQ ID NO: 5 в WO 2014/130812 для нумерации), или *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger* или *Aspergillus kawachi*. В другом варианте осуществления бета-глюкозидаза получена из *Penicillium*, такого как *Penicillium brasilianum*, раскрытая как SEQ ID NO:2 в WO 2007/019442, или из *Trichoderma*, такого как *Trichoderma reesei*, такие, как описано в US 6,022,725, US 6,982,159, US 7,045,332, US 7,005,289, US 2006/0258554 US 2004/0102619. В одном варианте осуществления можно применять даже бактериальную бета-глюкозидазу. В другом варианте осуществления бета-глюкозидаза получена из *Thielavia terrestris* (WO 2011/035029) или *Trichophaea saccata* (WO 2007/019442).

Например, ферменты для применения в настоящем изобретении могут включать эндоглюканазу (ЭГ) из *Trichoderma*, такого как *Trichoderma reesei*; из *Humicola*, такого как штамм *Humicola insolens*; из *Aspergillus*, такого как *Aspergillus aculeatus* или *Aspergillus kawachii*; из *Erwinia*, такого как *Erwinia carotovora*; из *Fusarium*, такого как *Fusarium oxysporum*; из *Thielavia*, такого как *Thielavia terrestris*; из *Humicola*, такого как *Humicola grisea* var. *thermoidea* или *Humicola insolens*; из *Melanocarpus*, такого как *Melanocarpus albomyces*; из *Neurospora*, такого как *Neurospora crassa*; из *Myceliophthora*, такого как *Myceliophthora thermophila*; из *Cladorrhinum*, такого как *Cladorrhinum foecundissimum* и/или из *Chrysosporium*, такого как штамм *Chrysosporium lucknowense*. В одном варианте осуществления можно применять даже бактериальную эндоглюканазу, включая эндоглюканазу *Acidothermus cellulolyticus* (см. WO 91/05039; WO 93/15186; US 5,275,944; WO 96/02551; US 5,536,655, WO 00/70031, WO 05/093050); эндоглюканазу III из *Thermobifida fusca* (см. WO 05/093050); и эндоглюканазу V из *Thermobifida fusca* (см. WO 05/093050), но не ограничиваясь ими.

Например, композиция для применения в способах из настоящем изобретении может включать целлобиогидролазу I из *Aspergillus*, такого как *Aspergillus fumigatus*,

такую как Cel7A CBH I, раскрытую в SEQ ID NO:6 в WO 2011/057140 или SEQ ID NO:6 в WO 2014/130812, или из *Trichoderma*, такого как *Trichoderma reesei*.

Например, композиция для применения в способах из настоящего изобретения может содержать целлобиогидролазу II из *Aspergillus*, такого как *Aspergillus fumigatus*, такую как SEQ ID NO:7 в WO 2014/130812, или из *Trichoderma*, такого как *Trichoderma reesei*, или из *Thielavia*, такого как *Thielavia terrestris*, такую как целлобиогидролаза II CEL6A из *Thielavia terrestris*.

Например, ферменты для применения в способах из настоящего изобретения может содержать полипептид GH61 (литическую полисахаридную монооксигеназу) из *Thermoascus*, такого как *Thermoascus aurantiacus*, такую как описано в WO 2005/074656 как SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:1 в WO2014/130812 и в WO 2010/065830; или из *Thielavia*, такого как *Thielavia terrestris*, такую как описано в WO 2005/074647 как SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO:4 в WO2014/130812 и в WO 2008/148131, и WO 2011/035027; или из *Aspergillus*, такого как *Aspergillus fumigatus*, такую как описано в WO 2010/138754 как SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO: 3 в WO2014/130812; или из *Penicillium*, такого как *Penicillium emersonii*, такую как описана как SEQ ID NO:2 в WO 2011/041397 или SEQ ID NO:2 в WO2014/130812. Другие подходящие полипептиды GH61 включают *Trichoderma reesei* (см. WO 2007/089290), *Myceliophthora thermophila* (см. WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, WO 2009/085868), *Penicillium pinophilum* (см. WO 2011/005867), *Thermoascus* sp. (см. WO 2011/039319), и *Thermoascus crustaceus* (см. WO 2011/041504), но не ограничиваются ими. В одном аспекте полипептид GH61 применяют в присутствии растворимого активирующего двухвалентного металлического катиона в соответствии с WO 2008/151043, например, магния сульфат. В одном аспекте полипептид GH61 применяют в присутствии диоксидного соединения, бициклического соединения, гетероциклического соединения, азотсодержащего соединения, хинонового соединения, серосодержащего соединения, или жидкости, полученной из предварительно обработанного целлюлозного материала, такого как предварительно обработанная кукурузная солома.

Другие целлюлолитические ферменты, которые можно использовать в композиции для применения в изобретении, описаны, например, в WO 98/13465, WO 98/015619, WO 98/015633, WO 99/06574, WO 99/10481, WO 99/025847, WO 99/031255, WO 2002/101078, WO 2003/027306, WO 2003/052054, WO 2003/052055, WO 2003/052056, WO 2003/052057, WO 2003/052118, WO 2004/016760, WO 2004/043980, WO 2004/048592, WO 2005/001065, WO 2005/028636, WO 2005/093050, WO 2005/093073, WO 2006/074005, WO 2006/117432, WO 2007/071818, WO 2007/071820, WO 2008/008070, WO 2008/008793, US 5,457,046, US

5,648,263, и US 5,686,593, с перечислением лишь небольшого количества.

Кроме того, примеры ксиланаз, применяемых в способах из настоящего изобретения, включают ксиланазы из *Aspergillus aculeatus* (см. WO 94/21785), *Aspergillus fumigatus* (см. WO 2006/078256), *Penicillium pinophilum* (см. WO 2011/041405), *Penicillium sp.* (см. WO 2010/126772), *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (см. WO 2009/079210), и *Trichophaea saccata* GH10 (см. WO 2011/057083), но не ограничиваются ими. Примеры бета-ксилозидаз, применяемых в интегрированных процессах из настоящего изобретения, включают бета-ксилозидазы из *Neurospora crassa* и *Trichoderma reesei*, но не ограничиваются ими. Примеры ацетилксилан-эстераз, пригодных в настоящем изобретении, включают ацетилксилан-эстеразы из *Aspergillus aculeatus* (см. WO 2010/108918), *Chaetomium globosum*, *Chaetomium gracile*, *Humicola insolens* DSM 1800 (см. WO 2009/073709), *Hyrocerea jecorina* (см. WO 2005/001036), *Myceliophthera thermophila* (см. WO 2010/014880), *Neurospora crassa*, *Phaeosphaeria nodorum* и *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (см. WO 2009/042846), но не ограничиваются ими. Примеры ферулоил-эстераз (эстераз феруловой кислоты), пригодных в настоящем изобретении, включают ферулоил-эстеразы из *Humicola insolens* DSM 1800 (см. WO 2009/076122), *Neosartorya fischeri*, *Neurospora crassa*, *Penicillium aurantiogriseum* (см. WO 2009/127729), и *Thielavia terrestris* (см. WO 2010/053838 и WO 2010/065448), но не ограничиваются ими. Примеры арабинофуранозидаз, пригодных в настоящем изобретении, включают арабинофуранозидазы из *Aspergillus niger*, *Humicola insolens* DSM 1800 (см. WO 2006/114094 и WO 2009/073383) и *M. giganteus* (см. WO 2006/114094), но не ограничиваются ими. Примеры альфа-глюкуронидаз, пригодных в настоящем изобретении, включают альфа-глюкуронидазы из *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Humicola insolens* (см. WO 2010/014706), *Penicillium aurantiogriseum* (см. WO 2009/068565) и *Trichoderma reesei*, но не ограничиваются ими.

Композиция для применения в настоящем изобретении может включать один, два, три, четыре или более классов целлюлазы, например, например, одну, две, три или четыре, или все из GH61, эндоглюканазу (ЭГ), одну или две экзоцеллобиогидролазы (ЦБГ) и бета-глюкозидазу (БГ). Композиция для применения в настоящем изобретении может содержать два или больше любых из этих классов целлюлазы.

Композиция из настоящего изобретения может включать активность иного типа целлюлазной активности и/или гемицеллюлазной активности и/или пектиназной активности, чем тот, который обеспечивается композицией для применения в способе из настоящего изобретения. Например, композиция из настоящего изобретения может

включать один тип целлюлазной и/или гемицеллюлазной активности и/или пектиназной активности, обеспеченной композицией, как описано в настоящей заявке, и второй тип целлюлазной и/или гемицеллюлазной активности и/или пектиназной активности, обеспеченной дополнительной целлюлазой/гемицеллюлазой/пектиназой.

В настоящей заявке целлюлаза является полипептидом, способным к деградации или модификации целлюлозы. Полипептид, способный к деградации целлюлозы, является полипептидом, способным к катализу процесса разрушения целлюлозы на единицы меньшего размера, либо частично, например, на целлодекстрины, либо полностью на глюкозные мономеры. Целлюлаза в соответствии с настоящим изобретением может давать начало смешанной популяции целлодекстринов и глюкозных мономеров при контакте с целлюлазой. Такая деградация, как правило, происходит путем реакции гидролиза.

Литические полисахаридные монооксигеназы (ЛПМО) недавно классифицированы CAZy в семейство AA9 (Семейство вспомогательной активности 9) и или семейство AA10 (Семейство вспомогательной активности 10). Как упоминалось выше, ЛПМО способны к открытию кристаллической глюкановой структуры. ЛПМО могут также влиять на целоолигосахариды. Термины ПМО и ЛПМО применяются взаимозаменяемо. Белки GH61 (семейства гликозил-гидролаз 61 или иногда обозначаемые как EGIV) являются (литическими) кислород-зависимыми полисахаридными монооксигеназами (ПМО/ЛПМО) в соответствии с последними литературными данными (Isaksen et al., *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 5, pp. 2632-2642). Часто в литературе эти белки упоминаются как усиливающие активность целлюлаз на лигноцеллюлозных субстратах. GH61 исходно классифицировали как эндоглюканазу, на основе определения очень слабой эндо-1,4- β -d-глюканазной активности у одного члена семейства. Термин «GH61», как применяется в настоящей заявке, необходимо понимать как семейство ферментов, разделяющее общие части консервативной последовательности и складки для классификации как семейство 61 из хорошо установленной системы классификации CAZY GH (<http://www.cazy.org/GH61.html>). Семейство гликозид-гидролаз 61 является членом семейства гликозид-гидролаз EC 3.2.1. GH61 применяется в настоящей заявке как часть целлюлаз. CBM33 (семейство 33 углевод-связывающего модуля) является литической полисахаридной монооксигеназой (см. Isaksen et al, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 5, pp. 2632-2642). CAZy недавно переклассифицировала CBM33 в AA10 (Семейство вспомогательной активности 10).

В настоящей заявке гемицеллюлаза является полипептидом, способным к деградации или модификации гемицеллюлозы. Таким образом, гемицеллюлаза способна к

деградации или модификации одного или более из ксилана, глюкуроноксилана, арабиноксилана, глюкоманнана и ксилогликана. Полипептид, способный к деградации гемицеллюлозы, является полипептидом, способным к катализу процесса разрушения гемицеллюлозы на полисахариды меньшего размера, либо частично, например, на олигосахариды, либо полностью на сахарные мономеры, например, гексозные или пентозные сахарные мономеры. Гемицеллюлаза в соответствии с изобретением может давать начало смешанной популяции олигосахаридов и сахарных мономеров при контакте с гемицеллюлазой. Такая деградация, как правило, осуществляется путем реакции гидролиза.

В настоящей заявке пектиназа является полипептидом, способным к деградации или модификации пектина. Полипептид, способный к деградации, является полипептидом, способным к катализу процесса разрушения пектина на единицы меньшего размера, либо частично, например, на олигосахариды, либо полностью на сахарные мономеры. Пектиназа в соответствии с изобретением может давать начало смешанной популяции олигосахаридов и сахарных мономеров при контакте с пектиназой. Такая деградация, как правило, осуществляется путем реакции гидролиза.

Соответственно, композиция из настоящего изобретения может включать любую целлюлазу, например, GN61, целлобиогидролазу, эндо- β -1,4-глюканазу, бета-глюкозидазу или β -(1,3)(1,4)-глюканазу.

Соответственно, целлобиогидролаза (ЕС 3.2.1.91) является любым полипептидом, способным к катализу гидролиза 1,4- β -D-глюкозидных связей в целлюлозе или целлотетраозе, с высвобождением целлобиозы с концов цепи. Этот фермент может также обозначаться как целлюлозо 1,4- β -целлобиозидаза, 1,4- β -целлобиогидролаза, 1,4- β -D-глюкан целлобиогидролаза, авицелаза, экзо-1,4- β -D-глюканаза, экзоцеллобиогидролаза или экзоглюканаза.

При этом эндо- β -1,4-глюканаза (ЕС 3.2.1.4) является полипептидом, способным к катализу эндогидролиза 1,4- β -D-глюкозидных связей в целлюлозных, лихениновых или злаковых β -D-глюканах. Такой полипептид может также быть способен к гидролизу 1,4-связей в β -D-глюканах, также содержащих 1,3-связи. Этот фермент может также обозначаться как целлюлаза, авицелаза, β -1,4-эндоглюкан-гидролаза, β -1,4-глюканаза, карбоксиметилцеллюлаза, целлюдекстриназа, эндо-1,4- β -D-глюканаза, эндо-1,4- β -D-глюканогидролаза, эндо-1,4- β -глюканаза или эндоглюканаза.

При этом бета-глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21) является любым полипептидом, способным к катализу гидролиза терминальных, невосстанавливающих β -D-глюкозных

остатков с высвобождением β -D-глюкозы. Такой полипептид может иметь широкую специфичность по отношению к β -D-глюкозидам, и может также гидролизовать одно или более из следующего: β -D-галактозид, α -L-арабинозид, β -D-ксилозид или β -D-фукозид. Этот фермент может также обозначаться как амигдалаза, β -D-глюкозид-глюкогидролаза, целлобиаза или гентобиаза.

При этом β -(1,3)(1,4)-глюканаза (ЕС 3.2.1.73) является любым полипептидом, способным к катализу гидролиза 1,4- β -D-глюкозидных связей в β -D-глюканах, содержащих 1,3- и 1,4-связи. Такой полипептид может действовать на лишениновые и злаковые β -D-глюканы, но не на β -D-глюканы, содержащие только 1,3- или 1,4-связи. Этот фермент может также обозначаться как лишениназа, 1,3-1,4- β -D-глюкан-4-глюканогидролаза, β -глюканаза, эндо- β -1,3-1,4-глюканаза, лишеназа или β -глюканаза смешанных связей. Альтернативой для этого типа фермента является ЕС 3.2.1.6, которая описана как эндо-1,3(4)-бета-глюканаза. Этот тип фермента гидролизует 1,3- или 1,4-связи в бета-D-глюканазе, когда глюкозный остаток, чья восстанавливающая группа вовлекается в связь, подвергающуюся гидролизу, сама замещается на C-3. Альтернативные наименования включают эндо-1,3-бета-глюканазу, ламинариназу, 1,3-(1,3;1,4)-бета-D-глюкан 3(4)-глюканогидролазу; субстраты включают ламинариновые, лишениновые и злаковые бета-D-глюканы.

Композиция из настоящего изобретения может включать гемицеллюлазу, например, эндоксилазу, β -ксилозидазу, α -L-арабинофуранозидазу, α -D-глюкуронидазу, ацетилксилан-эстеразу, ферулоил-эстеразу, кумароил-эстеразу, α -галактозидазу, β -галактозидазу, β -маннаназу, или β -маннозидазу.

При этом эндоксилаза (ЕС 3.2.1.8) является любым полипептидом, способным к катализу эндогидролиза 1,4- β -D-ксилозидных связей в ксиланах. Этот фермент может также обозначаться как эндо-1,4- β -D-ксиланаза или 1,4- β -D-ксилан-ксиланогидролаза. Альтернативной является ЕС 3.2.1.136, глюкуроноарабиноксилан-эндоксилаза, фермент, способный к гидролизу 1,4-ксилозидных связей в глюкуроноарабиноксиланах.

При этом β -ксилозидаза (ЕС 3.2.1.37) является любым полипептидом, способным к катализу гидролиза 1,4- β -D-ксиланов, для удаления последовательных остатков D-ксилозы из невозстанавливаемых концов. Такие ферменты могут также гидролизовать ксилобиозу. Этот фермент может также обозначаться как ксилан-1,4- β -ксилозидаза, 1,4- β -D-ксилан-ксилогидролаза, экзо-1,4- β -ксилозидаза или ксилобиаза.

При этом α -L-арабинофуранозидаза (ЕС 3.2.1.55) является любым полипептидом, способным к воздействию на α -L-арабинофуранозиды, α -L-арабинаны, содержащие (1,2)

и/или (1,3)- и/или (1,5)-связи, арабиноксиланы и арабиногалактаны. Этот фермент может также обозначаться как α -N-арабинофуранозидаза, арабинофуранозидаза или арабинозидаза.

При этом α -D-глюкуронидаза (ЕС 3.2.1.139) является любым полипептидом, способным к катализу реакции следующего вида: альфа-D-глюкуронидаза + Н(2)О = спирт + D-глюкуронат. Этот фермент может также обозначаться как альфа-глюкуронидаза или альфа-глюкозидураназа. Эти ферменты могут также гидролизовать 4-О-метилированную глюкуроновую кислоту, которая может также присутствовать в качестве заместителя в ксиланах. Альтернативой является ЕС 3.2.1.131, ксилан-альфа-1,2-глюкуронозидаза, которая катализирует гидролиз альфа-1,2-(4-О-метил)глюкуронозильных связей.

При этом ацетил-ксилан-эстераза (ЕС 3.1.1.72) является любым полипептидом, способным к катализу деацилирования ксиланов и ксилоолигосахаридов. Такой полипептид может катализировать гидролиз ацетильных групп из полимерного ксилана, ацетиловой ксиланозы, ацетиловой глюкозы, альфа-нафтил-ацетата или п-нитрофенил-ацетата, но как правило, не из триацетилглицерина. Такой полипептид, как правило, не действует на ацетилованный маннан или пектин.

При этом ферулоил-эстераза (ЕС 3.1.1.73) является полипептидом, способным к катализу реакции в виде: ферулоил-сахарид + Н(2)О = ферулат + сахарид. Сахарид может быть, например, олигосахаридом или полисахаридом. Он может, как правило, катализировать гидролиз 4-гидрокси-3-метоксициннамоильной (ферулоильной) группы их этерифицированного сахара, который обычно является арабинозой в «натуральных» субстратах. Как правило, п-нитрофенил ацетат и метил-ферулат являются более плохими субстратами. Этот фермент может также обозначаться как циннамоил-эфир-гидролаза, феруловой кислоты эстераза или гидроксидиннамоил-эстераза. Он может также обозначаться как гемицеллюлазный вспомогательный фермент, поскольку он может помогать ксиланазам и пектиназам разрушать гемицеллюлозу и пектин клеточной стенки растений.

При этом кумароил-эстераза (ЕС 3.1.1.73) является любым полипептидом, способным к катализу реакции вида: кумароил-сахарид + Н(2)О = кумарат + сахарид. Сахарид может быть, например, олигосахаридом или полисахаридом. Этот фермент может также обозначаться как транс-4-кумароил-эстераза, транс-п-кумароил-эстераза, п-кумароил-эстераза или эстераза п-кумаровой кислоты. Этот фермент также относится к ЕС 3.1.1.73, так что может также обозначаться как ферулоил-эстераза.

При этом α -галактозидаза (ЕС 3.2.1.22) является любым полипептидом, способным

к катализу гидролиза терминальных, невосстанавливающих α -D-галактозных остатков в α -D-галактозидах, включая галактозные олигосахариды, галактоманнаны, галактаны и арабиногалактаны. Такой полипептид может также быть способным к гидролизу α -D-фукозидов. Этот фермент может также обозначаться как мелибиаза.

При этом β -галактозидаза (ЕС 3.2.1.23) является любым полипептидом, способным к катализу гидролиза терминальных невосстанавливающих β -D-галактозных остатков в β -D-галактозидах. Такой полипептид может также быть способным к гидролизу α -L-арабинозидов. Этот фермент может также быть обозначен как экзо-(1 \rightarrow 4)- β -D-галактаназа или лактаза.

При этом β -маннаназа (ЕС 3.2.1.78) является полипептидом, способным к катализу произвольного гидролиза 1,4- β -D-маннозидных связей в маннанах, галактоманнанах и глюкоманнанах. Этот фермент может также быть обозначен как маннан-эндо-1,4- β -маннозидаза или эндо-1,4-маннаназа.

При этом β -маннозидаза (ЕС 3.2.1.25) является любым полипептидом, способным к катализу гидролиза терминальных, невосстанавливающих β -D-маннозных остатков в β -D-маннозидах. Этот фермент может также обозначаться как маннаназа или манназа.

Композиция из настоящего изобретения может содержать любую пектиназу, например, эндополигалактуроназу, пектин-метилэстеразу, эндогалактаназу, бета-галактозидазу, пектин-ацетилэстеразу, эндопектин-лиазу, пектат-лиазу, альфа-рамнозидазу, экзогалактуроназу, экзополигалактуронат-лиазу, рамногалактуронан-гидролазу, рамногалактуронан-лиазу, рамногалактуронан-ацетил-эстеразу, рамногалактуронан-галактуроногидролазу, ксилогалактуроназу.

При этом эндополигалактуроназа (ЕС 3.2.1.15) является любым полипептидом, способным к катализу произвольного гидролиза 1,4- α -D-галактозидуроновых связей в пектате и других галактуронанах. Этот фермент может также быть обозначен как полигалактуроназа пектин-деполимераза, пектиназа, эндополигалактуроназа, пектолаза, пектин-гидролаза, пектин-полигалактуроназа, поли- α -1,4-галактуронид-глюканогидролаза, эндогалактуроназа, эндо-D-галактуроназа или поли(1,4- α -D-галактуронид)гликаногидролаза.

При этом пектин-метил-эстераза (ЕС 3.1.1.11) является любым ферментом, способным к катализу реакции: пектин = n H₂O = n метанол + пектат. Фермент может также быть известен как пектин-эстераза, пектин-деметоксилаза, пектин-метоксилаза, пектин-метилэстераза, пектаза, пектиноэстераза или пектин-пектилгидролаза.

При этом эндогалактаназа (ЕС 3.2.1.89) является любым ферментом, способным к

катализу эндогидролиза 1,4-β-D-галактозидных связей в арабиногалактанах. Фермент может также быть известен как арабиногалактан-эндо-1,4-β-галактозидаза, эндо-1,4-β-галактаназа, галактаназа, арабиногалактаназа или арабиногалактан-4-β-D-галактаногидролаза.

При этом пектин-ацетилэстераза определяется в настоящей заявке как фермент, который обладает ацетил-эстеразной активностью, который катализирует деацетилирование ацетильных групп на гидроксильных группах GalUA остатков пектина.

При этом эндопектин-лиаза (ЕС 4.2.2.10) является ферментом, способным к катализу элиминационного расщепления (1→4)-α-D-галактуронан-метилового эфира до получения олигосахаридов с 4-дезоксиг-6-О-метил-α-D-галакт-4-енуронозильных групп на их невосстанавливающих концах. Фермент может также быть известен как пектин-лиаза, пектин-транс-элиминаза, эндопектин-лиаза, полиметилгалактуроновая трансэлиминаза, пектин-метилтрансэлиминаза, пектолиаза, ПЛ, ПНЛ или ПМГЛ или (1→4)-6-О-метил-α-D-галактуронан-лиаза.

При этом пектат-лиаза (ЕС 4.2.2.2) является ферментом, способным к катализу элиминирующего расщепления (1→4)-α-D-галактуронана с получением олигосахаридов с 4-дезоксиг-α-D-галакт-4-енуронозильных групп на их невосстанавливающих концах. Этот фермент может также быть известен как полигалактуроновая трансэлиминаза, пектиновой кислоты трансэлиминаза, полигалактуронат-лиаза, эндопектин-метилтрансэлиминаза, пектат-трансэлиминаза, эндогалактуронат-трансэлиминаза, пектиновой кислоты лиаза, пектиновая лиаза, α-1,4-D-эндополигалактуроновой кислоты лиаза, ПГА лиаза, ПШаза-N, эндо-α-1,4-полигалактуроновой кислоты лиаза, полигалактуроновой кислоты лиаза, пектин-трансэлиминаза, полигалактуроновой кислоты трансэлиминаза или (1→4)-α-D-галактуронан-лиаза.

При этом альфа-рамнозидаза (ЕС 3.2.1.40) является любым полипептидом, способным к катализу гидролиза терминальных невосстанавливающих α-L-рамнозных остатков в α-L-рамнозидах или альтернативно в рамногалактуронане. Этот фермент может также быть известен как α-L-рамнозидаза Т, α-L-рамнозидаза N или α-L-рамнозида рамногидролаза.

При этом экзогалактуроназа (ЕС 3.2.1.82) является любым полипептидом, способным к гидролизу пектиновой кислоты на невосстанавливаемом конце, с высвобождением дигалактуроната. Этот фермент может также быть известен как экзополи-α-галактуронозидаза, экзополигалактуронозидаза или экзополигалактуронозидаза.

При этом экзогалактуроназа (ЕС 3.2.1.67) является полипептидом, способным к катализу: $(1,4\text{-}\alpha\text{-D-галактуронид})_n + \text{H}_2\text{O} = (1,4\text{-}\alpha\text{-D-галактуронид})_{n-1} + \text{D-галактуронат}$. Фермент может также быть известен как галактуран-1,4- α -галактуронидаза, экзополигалактуроназа, поли(галактуронат)-гидролаза, экзо-D-галактуроназа, экзо-D-галактуронаназа, экзополи-D-галактуроназа или поли(1,4- α -D-галактуронид)-галактуроногидролаза.

При этом экзополигалактуронат-лиаза (ЕС 4.2.2.9) является полипептидом, способным к катализу элиминирующего расщепления 4-(4-дезоксид- α -D-галакт-4-енуронозил)-D-галактуроната с восстанавливающего конца пектата, т.е. деэтерифицированного пектина. Этот фермент может быть известен как пектат-дисахарид-лиаза, пектат-экзолиаза, экзопектиновой кислоты трансэлиминаза, экзопектат-лиаза, экзополигалактуроновой кислоты трансэлиминаза, ПКТЭ, экзо-ПКТЭ, экзо-ПГЛ или (1 \rightarrow 4)- α -D-галактуронана восстанавливающего конца дисахарид-лиаза.

При этом рамногалактуронан-гидролаза является полипептидом, способным к эндогидролизу связи между галактозилурононовой кислотой и рамнопиранозилом в строго чередующихся рамногалактуронановых структурах, состоящих из дисахарида [(1,2-альфа-L-рамноил-(1,4)-альфа-галактозилурононовой кислоты)].

При этом рамногалактуронан-лиаза является любым полипептидом, способным к расщеплению связей α -L-Рам_np-(1 \rightarrow 4)- α -D-Гал_pА эндообразом в рамногалактуронане путем бета-элиминации.

При этом рамногалактуронан-ацетилэстераза является любым полипептидом, катализирующим деацетилирование основного каркаса из чередующихся остатков рамнозы и галактуроновой кислоты в рамногалактуронане.

При этом рамногалактуронан-галактуроногидролаза является полипептидом, способным к экзогидролизу галактуроновой кислоты с восстанавливающего конца строго чередующихся рамногалактуронановых структур.

При этом ксилогалактуроназа является любым полипептидом, действующим на ксилогалактуронан путем расщепления каркаса из β -ксилозо-замещенной галактуроновой кислоты эндо-образом. Этот фермент может также быть известен как ксилогалактуронан-гидролаза.

При этом α -L-арабинофуранозидаза (ЕС 3.2.1.55) является любым полипептидом, способным к воздействию на α -арабинофуранозиды, α -арабинаны, содержащие (1,2) и/или (1,3)- и/или (1,5)-связи, арабиноксиланы и арабиногалактаны. Этот фермент может также обозначаться как α -N-арабинофуранозидаза, арабинофуранозидаза или

арабинозидаза.

При этом эндоарабиназа (ЕС 3.2.1.99) является любым полипептидом, способным к катализу эндогидролиза 1,5- α -арабинофуранозидных связей в 1,5-арабинах. Фермент может также быть известен как эндоарабиназа, арабинан-эндо-1,5- α -Ларабинозидаза, эндо-1,5- α -L-арабиназа, эндо- α -1,5-арабаназа, эндоарабаназа или 1,5 α -L-арабинан 1,5- α -L-арабинаногидролаза.

Композиция из настоящего изобретения, как правило, содержит по меньшей мере две целлюлазы и необязательно по меньшей мере одну гемицеллюлазу и необязательно по меньшей мере одну пектиназу (одна из которых является полипептидом в соответствии с настоящим изобретением). Композиция из настоящего изобретения может содержать GN61, целлобиогидролазу, эндоглюканазу и/или бета-глюкозидазу. Такая композиция может также содержать одну или несколько гемицеллюлаз и/или одну или несколько пектиназ.

Кроме того, одно или более (например, два, три, четыре или все) из амилазы, протеазы, липазы, лигниназы, гексозилтрансферазы, глюкуронидазы или экспанзина или индуцируемого целлюлозой белка или интегрирующего целлюлозу белка или подобного белка могут присутствовать в композиции из настоящего изобретения (они обозначаются как вспомогательные активности выше).

«Протеаза» включает ферменты, которые гидролизуют пептидные связи (пептидазы), а также ферменты, которые гидролизуют связи между пептидами и другими компонентами, такими как сахара (гликопептидазы). Многие протеазы характеризуются по ЕС 3.4, и пригодны для применения в настоящем изобретения, и включены посредством ссылки. Некоторые специфические типы протеаз включают цистеиновые протеазы, включая пепсин, папаин и сериновые протеазы, включая химотрипсин, карбоксипептидазы и металлоэндопептидазы.

«Липаза» включает ферменты, которые гидролизуют липиды, жирные кислоты и ацилглицериды, включая фосфоглицериды, липопротеины, диацилглицерины, и тому подобное. В растениях липиды применяются в качестве структурных компонентов для ограничения потери воды и инфекции патогенами. Эти липиды включают воски, полученные из жирных кислот, а также кутин и суберин.

«Лигниназа» включает ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать структуры лигниновых полимеров. Ферменты, которые могут разрушать лигнин, включают лигнин-пероксидазы, марганцевые пероксидазы, лакказы и ферулоил-эстеразы, а другие ферменты, описанные в данной области техники, известны как деполимеризующие или иным образом разрушающие лигниновые полимеры. Также

включены ферменты, способные гидролизовать связи между гемицеллюлозными сахарами (особенно арабинозой) и лигнином. Лигниназы включают следующие группы ферментов: лигнин-пероксидазы (ЕС 1.11.1.14), марганцевые пероксидазы (ЕС 1.11.1.13), лакказы (ЕС 1.10.3.2) и ферулоил-эстеразы (ЕС 3.1.1.73), но не ограничиваются ими.

«Гексозилтрансфераза» (2,4,1-) включает ферменты, которые способны к катализу трансферазной реакции, но которые также катализируют реакцию гидролиза, например, целлюлозы и/или продуктов деградации целлюлозы. Примером гексозилтрансферазы, которую можно применять в настоящем изобретении, является β -глюканозилтрансфераза. Такой фермент может быть способен к катализу деградации (1,3)(1,4)глюкана и/или целлюлозы и/или продукта деградации целлюлозы.

«Глюкуронидаза» включает ферменты, которые катализируют гидролиз глюкуронозида, например, β -глюкуронозида, с получением спирта. Многие глюкуронидазы охарактеризованы и могут быть пригодными для применения в настоящем изобретении, например, β -глюкуронидаза (ЕС 3.2.1.31), гиалуроноглюкуронидаза (ЕС 3.2.1.36), глюкуронозил-дисульфоглюкозамин-глюкуронидаза (3.2.1.56), глицирризинат- β -глюкуронидаза (3.2.1.128) или α -D-глюкуронидаза (ЕС 3.2.1.139).

Композиция для применения в настоящем изобретении может включать экспанзин или экспанзин-подобный белок, такой как сволленин (см. Salheimo et al., Eur. J. Biochem. 269, 4202-4211, 2002) или сволленин-подобный белок.

Экспанзины вовлечены в ослабление структуры клеточной стенки во время роста клеток растений. Экспанзины были предложены для разрушения водородных связей между целлюлозой и другими полисахаридами клеточной стенки без наличия гидролитической активности. Таким образом, предполагается, что они обеспечивают скольжение целлюлозных волокон и увеличение клеточной стенки. Сволленин, экспанзин-подобный белок, содержит N-концевой углевод-связывающего модуля семейства 1 домен (CBD) и C-концевой экспанзин-подобный домен. Для целей настоящего изобретения экспанзин-подобный белок или сволленин-подобный белок может содержать один или оба таких домена и/или может разрушать структуру клеточных стенок (например, разрушая целлюлозную структуру), необязательно без продукции выявляемых количеств восстанавливающих сахаров.

Композиция для применения в настоящем изобретении может быть индуцируемым целлюлозой белком, например, полипептидным продуктом *cip1* или *cip2* гена или подобных генов (см. Foreman et al., J. Biol. Chem. 278(34), 31988-31997, 2003), целлюлозу/целлулосому интегрирующим белком, например, полипептидным продуктом

гена *сірА* или *сірС*, или скаффолдином или скаффолдин-подобным белком. Скаффолдины и целлюлозу интегрирующие белки являются мультифункциональными интегрирующим субъединицами, которые могут организовать целлюлолитические субъединицы в мультиферментный комплекс. Это осуществляется путем взаимодействия двух комплементарных классов доменов, т.е. домена когезии на скаффолдине и домена докерин на каждой ферментативной единице. Субъединица скаффолдина также несет домен, связывающий целлюлозу (СВМ), который опосредует прикрепление целлюлосомы к её субстрату. Скаффолдин или белок, интегрирующий целлюлозу, для целей настоящего изобретения может включать оба таких домена.

Композиция для применения в настоящем изобретении может также включать каталазу. Термин «каталаза» означает перекись водорода: перекись водорода-оксидоредуктазу (ЕС 1.11.1.6 или ЕС 1.11.1.21), которая катализирует превращение двух перекисей водорода в кислород и две воды. Активность каталазы можно определить путем мониторинга деградации перекиси водорода при 240 нм на основе следующей реакции: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Реакцию проводят в 50 мМ фосфатном буфере при рН 7,0 при 25°C с 10,3 мМ субстратом (H_2O_2) и примерно 100 единицами фермента на мл. Поглощение контролируют спектрофотометрически в пределах 16-24 секунд, что должно соответствовать снижению поглощения от 0,45 до 0,4. Одна единица каталазной активности может быть выражена в виде деградации одного микромоля H_2O_2 в минуту при рН 7,0 и 25°C.

Композиция для применения в способе из настоящего изобретения может состоять из члена каждого класса ферментов, упомянутых выше, нескольких членов каждого класса ферментов, или любой комбинации этих классов ферментов и хелперных белков (т.е. белков, упомянутых в настоящей заявке, которые не обладают ферментативной активностью как таковой, но тем не менее способствуют деградации лигноцеллюлозы).

Композиция для применения в способе из настоящего изобретения может состоять из ферментов от (1) коммерческих поставщиков; (2) клонированных генов, экспрессирующих ферменты; (3) комплексного бульона (такого, как полученный при росте микробного штамма в среде, где штаммы секретируют белки и ферменты в среду); (4) клеточных лизатов при выращивании штаммов, как в пункте (3); и/или (5) растительного материала, экспрессирующего ферменты. Различные ферменты в композиции из настоящего изобретения могут быть получены из различных источников.

Ферменты могут быть получены экзогенным способом в микроорганизмах, дрожжах, грибах, бактериях или растениях, затем выделены и добавлены, например, в лигноцеллюлозный сырьевой материал. Альтернативно, ферменты получают, но не

выделяют, и неочищенный бульон от ферментации клеточной массы, или растительный материал (такой, как кукурузная солома или пшеничная солома) и тому подобное можно добавить, например, к сырьевому материалу. Альтернативно, неочищенную клеточную массу или среду от производства ферментов, или растительный материал можно обработать для предотвращения дальнейшего роста микроорганизмов (например, путем нагревания или добавления антимикробных агентов), затем добавить, например, к сырьевому материалу. Эти неочищенные смеси ферментов могут включать организм, продуцирующий фермент. Альтернативно, фермент может быть получен при ферментации, при которой применяется (предварительно обработанный) сырьевой материал (такой, как кукурузная солома или пшеничная солома) для обеспечения питания организма, продуцирующего фермент(ы). Таким образом, растения, продуцирующие ферменты, могут сами служить в качестве лигноцеллюлозного сырьевого материала, и могут быть добавлены в лигноцеллюлозный сырьевой материал.

В применениях и способах, описанных в настоящей заявке, компоненты из композиций, описанных выше, могут быть обеспечены совместно (т.е. в единой композиции как таковой) или по отдельности или последовательно.

Таким образом, изобретение относится к способам, в которых применяют композицию, описанную выше, и к применению композиции в промышленных процессах.

В одном варианте осуществления способов в соответствии с настоящим изобретением ферментная композиция находится в форме цельного ферментационного бульона от грибов. В одном варианте осуществления ферментная композиция может быть цельным ферментационным бульоном, как описано ниже. Цельный ферментационный бульон может быть приготовлен при ферментации нерекомбинантных и/или рекомбинантных мицелиальных грибов. В одном варианте осуществления мицелиальный грибок является рекомбинантным мицелиальным грибом, содержащим один или несколько генов, которые могут быть гомологичными или гетерологичными для мицелиальных грибов. В одном варианте осуществления мицелиальный грибок является рекомбинантным мицелиальным грибом, содержащим один или несколько генов, которые могут быть гомологичными или гетерологичными для мицелиального грибка, в котором один или несколько генов кодируют ферменты, которые могут разрушать целлюлозный субстрат. Цельный ферментационный бульон может содержать любые полипептиды или любую их комбинацию.

Предпочтительно, ферментная композиция является цельным ферментационным бульоном, где цельные клетки являются убитыми. Цельный ферментационный бульон может содержать органическую кислоту (кислоты) (используемую для лизиса клеток),

убитые клетки и/или клеточный детрит, и культуральную среду.

Как правило, мицелиальных грибки культивируют в среде для культивирования клеток, пригодной для получения фермента, способного к гидролизу целлюлозного субстрата. Культивирование осуществляют в подходящей питательной среде, содержащей источники углеводов и азота и неорганические соли, с применением процедур, известных в данной области техники. Подходящие среды для культивирования, температурные диапазоны и другие условия, пригодные для роста и выработки целлюлазы и/или гемицеллюлазы и/или пектиназы, известны в данной области техники. Цельный ферментационный бульон можно приготовить путем выращивания мицелиальных грибов до стационарной фазы и выдерживания мицелиальных грибов в условиях ограничения углерода в течение периода времени, достаточного для экспрессии одной или нескольких целюлаз и/или гемицеллюлаз и/или пектиназ. Как только ферменты, такие как целлюлазы и/или гемицеллюлазы и/или пектиназы, секретируются мицелиальными грибами в ферментационную среду, цельный ферментационный бульон можно использовать. Цельный ферментационный бульон из настоящего изобретения может содержать мицелиальные грибки. В некоторых вариантах осуществления цельный ферментационный бульон содержит не фракционированное содержимое ферментационных материалов, полученных к концу ферментации. Как правило, цельный ферментационный бульон содержит истощенную культуральную среду и клеточный детрит, присутствующий после выращивания мицелиальных грибов до насыщения, инкубации в условиях ограничения углерода для обеспечения синтеза белков (в частности, экспрессии целлюлаз и/или гемицеллюлаз и/или пектиназ). В некоторых вариантах осуществления цельный ферментационный бульон содержит истощенную среду для культивирования клеток, экстраклеточные ферменты и мицелиальные грибки. В некоторых вариантах осуществления мицелиальные грибки, присутствующие в цельном ферментационном бульоне, могут быть лизированы, пермеабиллизированы или убиты с применением способов, известных в данной области техники для получения цельного ферментационного бульона с лизированными клетками. В одном варианте осуществления цельный ферментационный бульон является цельным ферментационным бульоном с убитыми клетками, где цельный ферментационный бульон содержит клетки мицелиальных грибов, являющиеся лизированными или убитыми. В некоторых вариантах осуществления клетки убивают посредством лизиса мицелиальных грибов посредством химической и/или рН обработки для получения цельного бульона с лизированными клетками мицелиальных грибов. В некоторых вариантах осуществления клетки убивают путем лизиса мицелиальных грибов посредством химической и/или рН

обработки и подведения рН ферментационной смеси с убитыми клетками до подходящего значения рН. В одном варианте осуществления цельный ферментационный бульон содержит первый компонент из органической кислоты, содержащий органическую кислоту по меньшей мере с 1-5 атомами углерода и/или её соль, и второй компонент из органической кислоты, содержащий органическую кислоту по меньшей мере с 6 или более атомами углерода и/или её соль. В одном варианте осуществления первый компонент из органической кислоты является уксусной кислотой, муравьиной кислотой, пропионовой кислотой, её солью, или любой их комбинацией, а второй компонент из органической кислоты является бензойной кислотой, циклогексанкарбоновой кислотой, 4-метилвалериановой кислотой, фенилуксусной кислотой, её солью, или любой их комбинацией.

Термин «цельный ферментационный бульон», как применяется в настоящей заявке, означает препарат, полученный путем ферментации клеток, который не подвергается, или подвергается минимальному выделению и/или очистке. Например, получают цельный ферментационный бульон, где микробные культуры выращивают до насыщения, инкубируют в условиях ограничения углерода для обеспечения синтеза белков (например, экспрессии ферментов клетками-носителями) и секреции в среду культивирования клеток. Как правило, цельный ферментационный бульон является не фракционированным, и содержит истощенную среду для культивирования клеток, экстраклеточные ферменты, и микробные, предпочтительно нежизнеспособные клетки.

При необходимости цельный ферментационный бульон можно фракционировать, и можно применять одно или более из фракционированного содержимого. Например, лизированные клетки и/или клеточный детрит можно удалить из цельного ферментационного бульона для получения композиции, не содержащей этих компонентов.

Цельный ферментационный бульон может дополнительно содержать консервант и/или антимикробный агент. Такие консерванты и/или агенты известны в данной области техники.

Цельный ферментационный бульон, как описано в настоящей заявке, как правило, является жидкостью, но может содержать нерастворимые компоненты, такие как лизированные клетки, клеточный детрит, компоненты культуральной среды, и/или нерастворимый фермент(ы). В некоторых вариантах осуществления нерастворимые компоненты могут быть удалены для осветления цельного ферментационного бульона.

В одном варианте осуществления цельный ферментационный бульон может быть дополнен одной или несколькими ферментативными активностями, которые не

экспрессируются эндогенно, или экспрессируются на относительно низком уровне мицелиальными грибами, для улучшения деградации целлюлозного субстрата, например, до ферментируемых сахаров, таких как глюкоза или ксилоза. Дополнительный фермент(ы) может быть добавлен в виде добавки к цельному ферментационному бульону, а ферменты могут быть компонентом отдельного цельного ферментационного бульона, или могут быть очищены, или минимально извлечены и/или очищены.

В одном варианте осуществления цельный ферментационный бульон содержит цельный ферментационный бульон от ферментации рекомбинантных мицелиальных грибков, избыточно экспрессирующих один или несколько ферментов для улучшения деградации целлюлозного субстрата. Альтернативно, цельный ферментационный бульон может содержать смесь цельного ферментационного бульона от ферментации нерекомбинантного мицелиального грибка и рекомбинантного мицелиального грибка, избыточно экспрессирующего один или несколько ферментов для улучшения деградации целлюлозного субстрата. В одном варианте осуществления цельный ферментационный бульон включает цельный ферментационный бульон от ферментации мицелиальных грибков, избыточно экспрессирующих бета-глюкозидазу. Альтернативно, цельный ферментационный бульон для применения в настоящих способах и реактивных композициях может содержать смесь цельного ферментационного бульона от ферментации нерекомбинантного мицелиального грибка и цельного ферментационного бульона от ферментации рекомбинантного мицелиального грибка, избыточно экспрессирующего бета-глюкозидазу.

В одном варианте способ приготовления сахарного продукта из лигноцеллюлозного материала включает следующие этапы: (а) необязательно, предварительной обработки лигноцеллюлозного материала, (b) необязательно, промывания необязательно подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала, (с) получения ферментной композиции, содержащей по меньшей мере две целлюлазы, и где ферментная композиция по меньшей мере содержит ЛПМО, путем культивирования грибка в условиях, обеспечивающих экспрессию ферментной композиции, (d) ферментативного гидролиза необязательно промытого и/или необязательно подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала с применением ферментной композиции, и (е) необязательно, извлечения глюкозо-содержащей композиции, где количество образованных гидролизованных продуктов окисления в конце ферментативного гидролиза путем окисления ЛПМО лигноцеллюлозного материала, содержащего целлюлозу и/или целлоолигосахариды, поддерживается от 3 до 110 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном

материале, путем добавления подходящего количества кислорода после предварительной обработки и до и/или во время ферментативного гидролиза в лигноцеллюлозный материал, предпочтительно, образованный гидролизованный продукт окисления является глюконовой кислотой, альдоновой кислотой и/или геминальным диолом, более предпочтительно, гидролизованный продукт окисления является глюконовой кислотой.

В одном варианте осуществления способ получения продукта ферментации из лигноцеллюлозного материала включает следующие этапы: (a) необязательно, предварительной обработки лигноцеллюлозного материала, (b) необязательно, промывания необязательно подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала, (c) получения ферментной композиции, содержащей по меньшей мере две целлюлазы, и где ферментная композиция по меньшей мере содержит ЛПМО, путем культивирования грибка в условиях, обеспечивающих экспрессию ферментной композиции, (d) ферментативного гидролиза необязательно промытого и/или необязательно подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала с применением ферментной композиции, и (e) ферментации гидролизованного лигноцеллюлозного материала до получения продукта ферментации, и (f) необязательно, извлечения продукта ферментации, где количества образованных гидролизованных продуктов окисления в конце ферментативного гидролиза путем окисления ЛПМО лигноцеллюлозного материала, содержащего целлюлозу и/или целлоолигосахариды, поддерживается от 3 до 110 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, путем добавления подходящего количества кислорода после предварительной обработки и до и/или во время ферментативного гидролиза в лигноцеллюлозный материал, предпочтительно, образованный гидролизованный продукт окисления является глюконовой кислотой, альдоновой кислотой и/или геминальным диолом, более предпочтительно, гидролизованный продукт окисления является глюконовой кислотой.

Как указано выше, в предпочтительном варианте осуществления грибок является мицелиальным грибом, предпочтительно грибом, принадлежащим к роду *Rasamsonia* или *Aspergillus*. В одном варианте осуществления культивирование грибка осуществляют в аэробных условиях. Специалисту в данной области техники хорошо известны конструкции биореакторов для аэробного культивирования, например, таких как резервуары с перемешиванием и барботажные колонны. Как правило, грибки культивируют в среде для культивирования клеток, пригодной для получения интересующей ферментной композиции. Культивирование проводят в подходящей питательной среде, включающей источники углерода и азота и неорганические соли, с применением процедур, известных в данной области техники. Подходящие

культуральные среды, диапазоны температур и другие условия, подходящие для выращивания и продукции ферментов, известны в данной области техники. Их примеры описаны в настоящей заявке. Ферментную композицию можно приготовить путем выращивания грибков до стационарной фазы и выдерживания грибков в условиях ограничения углерода в течение периода времени, достаточного для экспрессии ферментов. Как только интересующие ферменты секретируются грибками в ферментационную среду, ферментную композицию можно использовать. Этапу способа получения ферментной композиции, включающей по меньшей мере две целлюлазы, и где ферментная композиция по меньшей мере содержит ЛПМО, посредством культивирования грибка в условиях, обеспечивающих экспрессию ферментной композиции, как описано в настоящей заявке, может предшествовать процесс размножения грибка. Размножение может включать несколько этапов во встряхиваемых флаконах, небольших контейнерах и больших контейнерах.

Лигноцеллюлозный материал

Лигноцеллюлозный материал в настоящей заявке включает любой лигноцеллюлозный и/или гемицеллюлозный материал. Лигноцеллюлозный материал, пригодный для применения в качестве сырьевого материала в настоящем изобретении, включает биомассу, например, первичную биомассу и/или непервичную биомассу, коммерческую органику, строительный и городской мусор, твердые коммунальные отходы, макулатуру и садовые отходы. Общие формы биомассы включают деревья, кустарники и траву, пшеницу, пшеничную солому, сахарный тростник, тростниковую солому, тростниково-сахарную багассу, отходы сахарного тростника, просо, мискантус, энергетический тростник, кукурузу, кукурузную солому, кукурузную шелуху, стержни кукурузных початков, стебли канолы, стебли сои, сахарное сорго, зерна кукурузы, включая волокна из зерен, продукты и субпродукты от помола зерен, таких как кукуруза, пшеница и ячмень (включая мокрый помол и сухой помол), часто обозначаемые как «отруби или волокно», а также коммунальные твердые отходы, макулатуру и садовые отходы. Биомасса также может быть травянистым материалом, сельскохозяйственными отходами, отходами лесного хозяйства, коммунальными твердыми отходами, макулатурой, и бумажной массой и отходами от производства бумаги, но не ограничивается ими. «Сельскохозяйственная биомасса» включает ветви, кусты, тростник, кукурузу и кукурузную шелуху, энергетические культуры, лесоматериал, плоды, цветы, зерна, траву, травянистые культуры, листья, кору, хвою, бревна, корни, побеги, древесные культуры с короткой ротацией, кустарники, просо, деревья, овощи, кожуру плодов, лианы, жом сахарной свеклы, пшеничные отруби, шелуху овса, и твердую и мягкую древесину

(не включая древесину с вредными материалами). Кроме того, сельскохозяйственная биомасса включает органические отходы, образуемые в сельскохозяйственных процессах, включая земледелие и лесное хозяйство, в особенности включая древесные отходы лесного хозяйства. Сельскохозяйственная биомасса может быть любой из вышеупомянутого, по отдельности или в комбинации, или их смесью.

Целлюлоза является органическим соединением с формулой $(C_6H_{10}O_5)_n$, полисахаридом, состоящим из линейной цепи от нескольких сотен до более десяти тысяч $\beta(1\rightarrow4)$ связанных D-глюкозных единиц. Глюкановая молекула является полисахаридом из D-глюкозных мономеров, связанных гликозидными связями. В настоящей заявке глюкан и целлюлоза применяются взаимозаменяемо для полисахарида из D-глюкозных мономеров, связанных гликозидными связями. Способы количественного анализа глюкановых или полисахаридных композиций хорошо известны и описаны в данной области техники, и обобщены, например, в Carvalho de Souza et al., Carbohydrate Polymers 95 (2013) 657-663. Как правило, от 50 до 70% глюкана является кристаллической целлюлозой, а остаток является аморфной целлюлозой.

Предварительная обработка

Лигноцеллюлозный материал, используемый в настоящем изобретении, может быть промыт и/или подвергнут предварительной обработке. Сырьевой материал может быть необязательно подвергнут предварительной обработке с нагреванием, механической и/или химической модификацией, или любой комбинацией таких способов, для повышения доступности субстрата для ферментативного гидролиза и/или гидролиза гемицеллюлозы и/или солюбилизации гемицеллюлозы и/или целлюлозы и/или лигнина, любым способом, известным в данной области техники. В одном варианте осуществления предварительную обработку проводят, обрабатывая лигноцеллюлозу паром, горячей водой или разбавленной кислотой или разбавленным основанием.

В одном варианте осуществления лигноцеллюлозный материал подвергают предварительной обработке до и/или во время ферментативного гидролиза. Способы предварительной обработки известны в данной области техники и включают нагревание, механическую, химическую модификацию, биологическую модификацию, и любую их комбинацию, но не ограничиваются ими. Предварительную обработку, как правило, проводят для повышения доступности лигноцеллюлозного материала для ферментативного гидролиза и/или гидролиза гемицеллюлозы и/или солюбилизации гемицеллюлозы и/или целлюлозы и/или лигнина, в лигноцеллюлозном материале. В одном варианте осуществления предварительная обработка включает обработку лигноцеллюлозного материала паром, обработку горячей водой или обработку

разбавленной кислотой или разбавленным основанием. Примеры способов предварительной обработки включают обработку паром (например, обработку при 100-260°C, под давлением 7-45 бар, при нейтральном pH, в течение 1-10 минут), обработку разбавленной кислотой (например, обработку с 0,1 – 5% H₂SO₄ и/или SO₂ и/или HNO₃ и/или HCl, в присутствии или при отсутствии пара, при 120-200°C, под давлением 2-15 бар, при кислом pH, в течение 2-30 минут), обработку органическим растворителем (например, обработку 1-1,5% H₂SO₄ в присутствии органического растворителя и пара, при 160-200°C, под давлением 7-30 бар, при кислом pH, в течение 30-60 минут), обработку известью (например, обработку 0,1-2% NaOH/Ca(OH)₂ в присутствии воды/пара при 60-160°C, под давлением 1-10 бар, при щелочном pH, в течение 60-4800 минут), ARP обработку (например, обработку 5-15% NH₃, при 150-180°C, под давлением 9-17 бар, при щелочном pH, в течение 10-90 минут), AFEX обработку (например, обработку с >15% NH₃, при 60-140°C, под давлением 8-20 бар, при щелочном pH, в течение 5-30 минут), но не ограничиваются ими.

Этап промывания

Необязательно, способ в соответствии с настоящим изобретением включает этап промывания. Факультативный этап промывания может применяться для удаления водорастворимых соединений, которые могут действовать в качестве ингибиторов для этапа ферментации. Этап промывания можно проводить обычным способом.

Лигноцеллюлозный материал может быть промыт. В одном варианте осуществления лигноцеллюлозный материал может быть промыт после предварительной обработки. Этап промывания можно применять для удаления водорастворимых соединений, которые могут действовать в качестве ингибиторов для этапа ферментации и/или гидролиза. Этап промывания можно проводить способом, известным специалистам в данной области техники. Вслед за промыванием, существуют другие способы детоксикации. Подвергнутый предварительной обработке лигноцеллюлозный материал может также быть подвергнут детоксикации любым (или комбинацией) из этих способов, которые включают отделение твердого вещества/жидкости, вакуумное упаривание, экстракцию, адсорбцию, нейтрализацию, избыточное известкование, добавление восстанавливающих агентов, добавление детоксицирующих ферментов, таких как лакказы или пероксидазы, добавление микроорганизмов, способных к детоксикации гидролизатов, но не ограничиваются ими.

Ферментативный гидролиз

Ферментная композиция, используемая в способе из настоящего изобретения, может крайне эффективно гидролизовать лигноцеллюлозный материал, например,

кукурузную солому, пшеничную солому, тростниковую солому, и/или тростниково-сахарную багассу, которую можно затем превратить в полезный продукт, такой как этанол, биогаз, бутанол, молочная кислота, пластик, органическая кислота, растворитель, добавка к корму животных, фармацевтическое средство, витамин, аминокислота, фермент или химический сырьевой материал. Кроме того, промежуточные продукты от процесса после гидролиза, например, молочную кислоту в качестве промежуточного продукта при производстве биогаза, можно применять в качестве стандартного блока для других материалов. Настоящее изобретение сопровождается примерами производства этанола, но они приводятся с целью иллюстрации, а не ограничения, также можно производить другие упомянутые полезные продукты.

Способ в соответствии с настоящим изобретением включает этап ферментативного гидролиза. Ферментативный гидролиз включает гидролиз с целью охижения сырьевого материала, и гидролиз с целью высвобождения сахара из сырьевого материала, или то и другое, но не ограничивается ими. На этом этапе необязательно подвергнутый ферментативной обработке и необязательно промытый лигноцеллюлозный материал приводят в контакт с ферментативной композицией в соответствии с настоящим изобретением. В зависимости от лигноцеллюлозного материала и предварительной обработки, различные условия реакции, например, температура, дозировка фермента, время реакции гидролиза и концентрация сухого вещества могут быть приспособлены специалистом в данной области техники для достижения необходимого превращения лигноцеллюлозы в сахар. Далее приведены некоторые указания.

В одном варианте осуществления ферментативный гидролиз включает по меньшей мере этап охижения, где лигноцеллюлозный материал гидролизуют по меньшей мере в первом контейнере, и этап сахарификации, где охиженный лигноцеллюлозный материал гидролизуют по меньшей мере в первом контейнере и/или по меньшей мере во втором контейнере. Сахарификацию можно проводить в том же самом контейнере, что и охижение (т.е. по меньшей мере в первом контейнере), её можно также проводить в отдельном контейнере (т.е. по меньшей мере во втором контейнере). Таким образом, ферментативный гидролиз из способов в соответствии с настоящим изобретением можно комбинировать охижение и сахарификацию. Альтернативно, охижение и сахарификация могут быть отдельными этапами. Охижение и сахарификацию можно проводить при различных температурах, но также можно проводить при одной и той же температуре. В одном варианте осуществления температура охижения выше температуры сахарификации. Охижение предпочтительно проводят при температуре 60-75°C, а сахарификацию предпочтительно проводят при температуре 50-65°C.

Ферменты, используемые в ферментативном гидролизе, можно добавлять до и/или во время ферментативного гидролиза. В случае, если ферментативный гидролиз включает этап ожигения и этап сахарификации, дополнительные ферменты могут быть добавлены во время и/или после этапа ожигения. Дополнительные ферменты могут быть добавлены до и/или во время этапа сахарификации. Дополнительные ферменты могут также быть добавлены после этапа сахарификации.

В одном аспекте изобретения гидролиз проводят при температуре 45°C или выше, 50°C или выше, 55°C или выше, 60°C или выше, 65°C или выше, или 70°C или выше. Высокая температура при гидролизе имеет многие преимущества, которые включают работу при оптимальной температуре ферментной композиции, снижение риска (бактериальной) контаминации, снижение вязкости, меньшее количество необходимой для охлаждения воды, применение охлаждающей воды с более высокой температурой, повторное применение ферментов, и т.д.

Вязкость лигноцеллюлозного материала в одном или нескольких контейнерах, используемых для ферментативного гидролиза, сохраняют от 10 до 4000 сП, от 10 до 2000 сП, предпочтительно от 10 до 1000 сП.

В случае, если способ включает ферментативный гидролиз, включающий этап ожигения и этап сахарификации, вязкость лигноцеллюлозного материала на этапе ожигения сохраняют от 10 до 4000 сП, от 10 до 2000 сП, предпочтительно от 10 до 1000 сП, и/или вязкость лигноцеллюлозного материала на этапе сахарификации сохраняют от 10 до 1000 сП, от 10 до 900 сП, предпочтительно от 10 до 800 сП.

Вязкость можно определить с реометром Brookfield DV III при температуре, используемой для гидролиза.

В другом аспекте изобретения количество добавленной ферментной композиции (также называемое дозировкой фермента или нагрузкой фермента) является низким. В одном варианте осуществления количество фермента составляет 6 мг белка/г массы сухого вещества или ниже, 5 мг белка/г массы сухого вещества или ниже, 4 мг белка/г массы сухого вещества или ниже, 3 мг белка/г массы сухого вещества или ниже, 2 мг белка/г массы сухого вещества или ниже, или 1 мг белка/г массы сухого вещества или ниже (выражено в виде белка, в мг белка на г сухого вещества). В одном варианте осуществления количество фермента составляет 0,5 мг фермента/г массы сухого вещества или ниже, 0,4 мг ферментной композиции/г массы сухого вещества или ниже, 0,3 мг фермента/г массы сухого вещества или ниже, 0,25 мг фермента/г массы сухого вещества или ниже, 0,20 мг фермента/г массы сухого вещества или ниже, 0,18 мг фермента/г массы сухого вещества или ниже, 0,15 мг фермента/г массы сухого вещества или ниже, или 0,10

мг фермента/г массы сухого вещества или ниже (выражено в виде всех целлюлазных ферментов в мг фермента на г сухого вещества). Низкая дозировка фермента возможна, поскольку благодаря активности и стабильности ферментов можно повысить время реакции гидролиза.

В другом аспекте изобретения время реакции гидролиза составляет 5 часов или больше, 10 часов или больше, 20 часов или больше, 40 часов или больше, 50 часов или больше, 60 часов или больше, 70 часов или больше, 80 часов или больше, 90 часов или больше, 100 часов или больше, 120 часов или больше, 130 часов или больше. В другом аспекте время реакции гидролиза составляет от 5 до 150 часов, от 40 до 130 часов, от 50 до 120 часов, от 60 до 120 часов, от 60 до 110 часов, от 60 до 100 часов, от 70 до 100 часов, от 70 до 90 часов, или от 70 до 80 часов. Благодаря стабильности ферментной композиции, возможно более продолжительное время реакции гидролиза с соответствующими более высокими выходами сахаров.

Значение pH во время гидролиза может быть выбрано специалистом в данной области техники. В другом аспекте изобретения pH во время гидролиза может составлять от 3,0 до 6,4. Стабильные ферменты из настоящего изобретения могут иметь широкий диапазон pH до 2 единиц pH, до 3 единиц pH, до 5 единиц pH. Оптимальное значение pH может находиться в пределах pH от 2,0 до 8,0, от 3,0 до 8,0, от 3,5 до 7,0, от 3,5 до 6,0, от 3,5 до 5,0, от 3,5 до 4,5, от 4,0 до 4,5, или составляет около 4,2.

В другом аспекте изобретения этап гидролиза проводят, пока не высвободится до 70% или больше, 80% или больше, 85% или больше, 90% или больше, 92% или больше, 95% или больше доступного сахара в лигноцеллюлозном материале.

Важно, что способ из настоящего изобретения можно проводить с применением высоких уровней сухого вещества (или лигноцеллюлозного материала) в реакции гидролиза. Таким образом, изобретение можно осуществлять с содержанием сухого вещества примерно 5 масс.% или больше, примерно 8 масс.% или больше, примерно 10 масс.% или больше, примерно 11 масс.% или больше, примерно 12 масс.% или больше, примерно 13 масс.% или больше, примерно 14 масс.% или больше, примерно 15 масс.% или больше, примерно 20 масс.% или больше, примерно 25 масс.% или больше, примерно 30 масс.% или больше, примерно 35 масс.% или больше, примерно 40 масс.% или больше. В другом варианте осуществления содержание сухого вещества на этапе гидролиза составляет 14 масс.%, 15 масс.%, 16 масс.%, 17 масс.%, 18 масс.%, 19 масс.%, 20 масс.%, 21 масс.%, 22 масс.%, 23 масс.%, 24 масс.%, 25 масс.%, 26 масс.%, 27 масс.%, 28 масс.%, 29 масс.%, 30 масс.%, 31 масс.%, 32 масс.%, 33 масс.% или больше, или от 14 до 33 масс.%. В другом варианте осуществления содержание сухого вещества в конце гидролиза

составляет 5 масс.% или больше, 6 масс.% или больше, 7 масс.% или больше, 8 масс.% или больше, 9 масс.% или больше, 10 масс.% или больше, 11 масс.% или больше, 12 масс.% или больше, 13 масс.% или больше, 14 масс.% или больше, 15 масс.% или больше, 16 масс.% или больше, 17 масс.% или больше, 18 масс.% или больше, 19 масс.% или больше, 20 масс.% или больше, 21 масс.% или больше, 22 масс.% или больше, 23 масс.% или больше, 24 масс.% или больше, 25 масс.% или больше, 26 масс.% или больше, 27 масс.% или больше, 28 масс.% или больше, 29 масс.% или больше, 30 масс.% или больше, 31 масс.% или больше, 32 масс.% или больше, 33 масс.% или больше, 34 масс.% или больше, 35 масс.% или больше, 36 масс.% или больше, 37 масс.% или больше, 38 масс.% или больше, или 39 масс.% или больше. В другом варианте осуществления содержание сухого вещества в конце ферментативного гидролиза составляет 5 масс.% - 40 масс.%, 6 масс.% - 40 масс.%, 7 масс.% - 40 масс.%, 8 масс.% - 40 масс.%, 9 масс.% - 40 масс.%, 10 масс.% - 40 масс.%, 11 масс.% - 40 масс.%, 12 масс.% - 40 масс.%, 13 масс.% - 40 масс.%, 14 масс.% - 40 масс.%, 15 масс.% - 40 масс.%, 16 масс.% - 40 масс.%, 17 масс.% - 40 масс.%, 18 масс.% - 40 масс.%, 19 масс.% - 40 масс.%, 20 масс.% - 40 масс.%, 21 масс.% - 40 масс.%, 22 масс.% - 40 масс.%, 23 масс.% - 40 масс.%, 24 масс.% - 40 масс.%, 25 масс.% - 40 масс.%, 26 масс.% - 40 масс.%, 27 масс.% - 40 масс.%, 28 масс.% - 40 масс.%, 29 масс.% - 40 масс.%, 30 масс.% - 40 масс.%, 31 масс.% - 40 масс.%, 32 масс.% - 40 масс.%, 33 масс.% - 40 масс.%, 34 масс.% - 40 масс.%, 35 масс.% - 40 масс.%, 36 масс.% - 40 масс.%, 37 масс.% - 40 масс.%, 38 масс.% - 40 масс.%, 39 масс.% - 40 масс.%.

Ферментация

Способ в соответствии с настоящим изобретением включает этап ферментации. Ферментацию можно проводить одновременно с гидролизом в одном реакторе (SSF). Предпочтительно, ферментацию проводят после гидролиза, и можно выбрать оптимальные условия для гидролиза и для ферментации, которые могут различаться для гидролиза и для ферментации. Таким образом, в другом аспекте изобретение включает на этапе ферментации процесс, при котором используют микроорганизмы для ферментации источника углерода, включающего сахар(а), например, глюкозу, L-арабинозу и/или ксилозу. Источник углерода может включать любой углеводный олиго- или полимер, содержащий L-арабинозные, ксилозные или глюкозные единицы, например, такие как лигноцеллюлоза, ксиланы, целлюлоза, крахмал, арабинан и тому подобное. Для высвобождения ксилозных или глюкозных единиц из таких углеводов, подходящие карбогидразы (такие, как ксиланазы, глюканазы, амилазы и тому подобные) могут быть добавлены к ферментационной среде, или могут продуцироваться модифицированной клеткой-носителем. В последнем случае модифицированная клетка-носитель может быть

создана генно-инженерными методами для продукции и экскреции таких карбогидраз. Дополнительным преимуществом применения олиго- и полимерных источников глюкозы является то, что они обеспечивают сохранение низкой (более низкой) концентрации свободной глюкозы при ферментации, например, путем применения лимитирующих скорость количеств карбогидраз. Это, в свою очередь, предотвращает репрессию систем, необходимых для метаболизма и транспорта неглюкозных сахаров, таких как ксилоза. В предпочтительном способе модифицированные клетки-носители ферментируют как L-арабинозу (необязательно, ксилозу), так и глюкозу, предпочтительно одновременно; в этом случае предпочтительно применяют модифицированные клетки-носители, которые являются нечувствительными к подавлению глюкозы для предотвращения диауксического роста. В дополнение к источнику L-арабинозы, необязательно, ксилозы (и глюкозы) в качестве источника углерода, ферментационная среда дополнительно содержит подходящий ингредиент, необходимый для роста модифицированной клетки-носителя. Составы ферментационных сред для выращивания микроорганизмов, таких как дрожжи и мицелиальные грибки, хорошо известны в данной области техники.

Время ферментации может быть короче, чем при обычной ферментации в тех же условиях, где часть ферментативного гидролиза все еще должна происходить во время ферментации. В одном варианте осуществления время ферментации составляет 100 часов или меньше, 90 часов или меньше, 80 часов или меньше, 70 часов или меньше, или 60 часов или меньше, для сахарной композиции из 50 г/л глюкозы и соответствующих других сахаров из лигноцеллюлозного сырьевого материала (например, 50 г/л ксилозы, 35 г/л L-арабинозы и 10 г/л галактозы). Для более разбавленных сахарных композиций время ферментации может соответственно быть снижено.

Процесс ферментации может быть аэробным или анаэробным процессом ферментации. Анаэробный процесс ферментации определяется в настоящей заявке как процесс ферментации, проходящий при отсутствии кислорода, или в котором по существу не потребляется кислород, предпочтительно потребляется менее 5, 2,5 или 1 ммоль/л/ч, более предпочтительно 0 ммоль/л/ч (т.е. потребление кислорода не выявляется), и где органические молекулы служат в качестве доноров электронов и акцепторов электронов. При отсутствии кислорода НАДН, продуцируемый при гликолизе и образовании биомассы, не может быть окислен посредством окислительного фосфорилирования. Для решения этой проблемы многие микроорганизмы применяют пируват или одно из его производных в качестве акцептора электрона и водорода, таким образом, регенерируя НАД⁺. Таким образом, в предпочтительном анаэробном процессе ферментации пируват применяют в качестве акцептора электрона (и водорода), и восстанавливают до таких

продуктов ферментации, как этанол, молочная кислота, 3-гидроксипропионовая кислота, акриловая кислота, уксусная кислота, янтарная кислота, лимонная кислота, яблочная кислота, фумаровая кислота, аминокислота, 1,3-пропандиол, этилен, глицерин, бутанол, β -лактамы антибиотики и цефалоспорин. В предпочтительном варианте осуществления процесс ферментации является анаэробным. Анаэробный процесс является предпочтительным, поскольку он дешевле аэробного процесса: требуется меньше специального оборудования. Далее, предполагается, что анаэробные процессы дают более высокий выход, чем аэробные процессы. В аэробных условиях обычно выход биомассы выше, чем в анаэробных условиях. В результате обычно в аэробных условиях ожидаемый выход продукта ниже, чем в анаэробных условиях.

В другом варианте осуществления процесс ферментации проводят в условиях ограничения кислорода. Более предпочтительно, процесс ферментации является аэробным и осуществляется в условиях ограничения кислорода. Процесс ферментации с ограничением кислорода является процессом, в котором потребление кислорода ограничено переносом кислорода из газа в жидкость. Степень ограничения кислорода определяется количеством и составом приходящего потока газа, а также действительным перемешиванием/свойствами массового переноса используемого оборудования для ферментации. Предпочтительно, в процессе в условиях ограничения кислорода скорость потребления кислорода составляет по меньшей мере 5,5, более предпочтительно по меньшей мере 6, и еще более предпочтительно по меньшей мере 7 ммоль/л/ч.

Процесс ферментации предпочтительно проходит при температуре, оптимальной для модифицированной клетки. Таким образом, для большинства дрожжевых или грибковых клеток процесс ферментации проводят при температуре меньше 42°C, предпочтительно меньше 38°C. Для дрожжевых и грибковых клеток-носителей процесс ферментации предпочтительно проводят при температуре ниже 35, 33, 30 или 28°C, и температуре выше 20, 22 или 25°C.

В одном варианте осуществления изобретения этап ферментации проводят с микроорганизмом, способным к ферментации по меньшей мере одного C5 сахара. В одном варианте осуществления процесс является процессом для получения этанола, где процесс включает этап, включающий ферментацию среды, содержащей сахар(а), с микроорганизмом, способным к ферментации по меньшей мере одного C5 сахара, где клетка-носитель способна к ферментации глюкозы, L-арабинозы и ксилозы в этанол. Микроорганизм может быть прокариотическим или эукариотическим организмом. Микроорганизм, используемый в процессе, может быть микроорганизмом, полученным посредством генной инженерии. Примерами подходящих организмов являются дрожжи,

например, *Saccharomyces*, например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* или *Saccharomyces uvarum*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, например, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia*, например, *Pichia stipites* или *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces*, например, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida*, например, *Candida pseudotropicalis* или *Candida acidothermophilum*, *Pachysolen*, например, *Pachysolen tannophilus*, или бактерии, например, *Lactobacillus*, например, *Lactobacillus lactis*, *Geobacillus*, *Zymomonas*, например, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium*, например, *Clostridium phytofermentans*, *Escherichia*, например, *E. coli*, *Klebsiella*, например, *Klebsiella oxytoca*. В одном варианте осуществления микроорганизмом, способным к ферментации по меньшей мере одного С5 сахара, являются дрожжи. В одном варианте осуществления дрожжи принадлежат к роду *Saccharomyces*, предпочтительно к виду *Saccharomyces cerevisiae*, в котором выполнены генетические модификации. Пример такого микроорганизма и его приготовление описано более подробно в WO 2008/041840 и в Европейской патентной заявке EP10160622.6, поданной 21 апреля 2010. В одном варианте осуществления процесс ферментации для получения этанола является анаэробным. Термин «анаэробный» уже определен в настоящей заявке. В другом предпочтительном варианте осуществления процесс ферментации для получения этанола является аэробным. В другом предпочтительном варианте осуществления процесс ферментации для получения этанола проводится в условиях ограничения кислорода, более предпочтительно в аэробных условиях и с ограничением кислорода. Условия с ограничением кислорода уже описаны выше.

В таком процессе объемная производительность этанола предпочтительно составляет по меньшей мере 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 5,0 или 10,0 г этанола на литр в час. Выход этанола по L-арабинозе и необязательно ксилозе и/или глюкозе в процессе предпочтительно составляет по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 98%. Выход этанола в настоящей заявке определяется как процент от теоретического максимального выхода, который для глюкозы и L-арабинозы и необязательно для ксилозы составляет 0,51 грамм этанола на грамм глюкозы или ксилозы.

В одном аспекте процесс ферментации, приводящий к получению этанола, имеет несколько преимуществ, по сравнению с известными процессами ферментации для получения этанола:

- возможны анаэробные процессы;
- возможны также условия с ограничением кислорода;
- можно достичь более высоких выходов этанола и скоростей продукции этанола;
- используемый штамм может быть способен к применению L-арабинозы и необязательно ксилозы.

В качестве альтернативы для процессов ферментации, описанных выше, можно применять по меньшей мере две различных клетки, это означает, что процесс является процессом совместной ферментации. Все предпочтительные варианты процессов ферментации, как описано выше, также являются предпочтительными вариантами осуществления этих процессов совместной ферментации: идентичность продукта ферментации, идентичность источника L-арабинозы и источника ксилозы, условия ферментации (аэробные или анаэробные условия, условия ограничения кислорода, температура, при которой осуществляют процесс, производительность этанола, выход этанола).

Процесс ферментации можно проводить без какого-либо требования к подведению рН во время процесса. То есть, процесс является процессом, который можно проводить без добавления какой-либо кислоты (кислот) или основания (оснований). Однако это исключает этап предварительной обработки, где можно добавлять кислоту. Дело в том, что композиция из настоящего изобретения способна действовать при низком рН, и таким образом, нет необходимости подводить рН предварительного обработанного кислотой сырьевого материала, чтобы обеспечить осахаривание или гидролиз. Соответственно, способ из настоящего изобретения может быть безотходным способом с применением только органических продуктов без необходимости ввода неорганических химикатов.

Общее время реакции

В соответствии с изобретением, общее время реакции (или совместное время реакции этапа гидролиза и этапа ферментации) может быть снижено. В одном варианте осуществления общее время реакции составляет 300 часов или меньше, 200 часов или меньше, 150 часов или меньше, 140 часов или меньше, 130 часов или меньше, 120 часов или меньше, 110 часов или меньше, 100 часов или меньше, 90 часов или меньше, 80 часов или меньше, 75 часов или меньше, или примерно 72 часа при 90% выходе глюкозы. Соответственно, можно достичь снижения общего времени при более низком выходе глюкозы.

Продукты ферментации

Продукты ферментации, которые можно получить в соответствии с изобретением, включают аминокислоты, витамины, фармацевтические средства, добавки в корм животных, химикаты специального назначения, химические сырьевые материалы, пластики, растворители, топливо, или другие органические полимеры, молочную кислоту и этанол, включая топливный этанол (термин «этанол» подразумевает включение этилового спирта или смесей этилового спирта и воды).

Специфические ценные продукты, которые могут быть произведены посредством

способов из настоящего изобретения, включают биотопливо (включая биогаз, этанол и бутанол); молочную кислоту; 3-гидроксипропионовую кислоту; акриловую кислоту; уксусную кислоту; 1,3-пропан-диол; этилен; глицерин; пластик; химикат специального назначения; органическую кислоту, включая лимонную кислоту, янтарную кислоту и малеиновую кислоту; растворитель; добавку в корм животных; фармацевтическое средство, такое как β -лактамный антибиотик или цефалоспорин; витамин; аминокислоту, такую как лизин, метионин, триптофан, треонин и аспарагиновая кислота; фермент, такой как протеаза, целлюлаза, амилаза, глюканаза, лактаза, липаза, лиаза, оксидоредуктаза, трансфераза или ксиланаза; химический сырьевой материал; или добавку в корм животных, но не ограничиваются ими.

Продукты ферментации, которые можно получить посредством способом из настоящего изобретения, могут быть любым веществом, полученным ферментацией. Они включают спирты (такие, как арабинитол, бутанол, этанол, глицерин, метанол, 1,3-пропандиол, сорбитол и ксилитол); органическую кислоту (такую, как уксусная кислота, ацетоновая кислота, адипиновая кислота, аскорбиновая кислота, акриловая кислота, лимонная кислота, 2,5-дикето-D-глюконовая кислота, муравьиная кислота, фумаровая кислота, глюкарловая кислота, глюконовая кислота, глюкуроновая кислота, глутаровая кислота, 3-гидроксипропионовая кислота, итаконовая кислота, молочная кислота, малеиновая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота, щавелевая кислота, щавелевоуксусная кислота, пропионовая кислота, янтарная кислота и ксилоновая кислота); кетоны (такие, как ацетон); аминокислоты (такие, как аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, глицин, лизин, серин, триптофан и треонин); алканы (такие, как пентан, гексан, гептан, октан, нонан, декан, ундекан и додекан), циклоалканы (такие, как циклопентан, циклогексан, циклогептан и циклооктан), алкены (такие, как пентен, гексен, гептен и октен); и газы (такие, как метан, водород (H_2), диоксид углерода (CO_2) и монооксид углерода (CO)), но не ограничиваются ими. Продукт ферментации может также быть белком, витамином, фармацевтическим средством, добавкой в корм животных, химикатом специального назначения, химическим сырьевым материалом, пластиком, растворителем, этиленом, ферментом, таким как протеаза, целлюлаза, амилаза, глюканаза, лактаза, липаза, лиаза, оксидоредуктаза, трансфераза или ксиланаза.

Отделение продукта ферментации

Способ в соответствии с настоящим изобретением необязательно включает выделение продукта ферментации. Продукт ферментации может быть отделен от ферментационного бульона любым известным способом. Таким образом, для каждого продукта специалист в данной области техники может выбрать подходящую методику

отделения. Например, этанол может быть отделен от дрожжевого ферментационного бульона путем дистилляции, например, дистилляции паром/вакуумной дистилляции обычным способом.

Некоторые варианты осуществления изобретения далее описаны более подробно, но без ограничения каким-либо образом объема настоящего изобретения.

Применение термостабильных ферментов в оптимальных температурных условиях

В одном варианте осуществления изобретение относится к применению термостабильных ферментов, таких как целлюлолитические ферменты из *Rasamsonia*, для получения восстанавливающих сахаров из предварительно обработанного лигноцеллюлозного сырьевого материала при продукции этанола, но не ограничиваясь ей. Целлюлолитические ферменты из *Rasamsonia*, применяемые на предварительно обработанном лигноцеллюлозном сырьевом материале, показали максимальные скорости превращения при температуре в диапазоне от 50 до 70°C. Фермент остается активным в этих условиях в течение 14 суток и больше без полной потери активности.

С применением оптимальных температурных условий можно высвободить максимальное количество восстанавливающих сахаров из сырьевого материала (полный гидролиз) с наикратчайшим возможным временем гидролиза. Таким способом достигается 100% превращение целлюлозы в глюкозы менее чем за 5 дней.

Теоретический максимальный выход ($Y_{ps\ max}$ в граммах продукта на грамм глюкозы) для ферментационного продукта может быть получен из учебника по биохимии. Для этанола 1 моль глюкозы (180 г) дает в соответствии с нормальным путем ферментации в виде гликолиза по меньшей мере 2 моль этанола ($=2 \times 46 = 92$ г этанола). Теоретический максимальный выход этанола по глюкозе, таким образом, составляет $92/180 = 0,511$ г этанола/г глюкозы.

Для бутанола (М.м. 74 г/моль) или изобутанола теоретический максимальный выход составляет 1 моль бутанола на моль глюкозы. Таким образом, $Y_{ps\ max}$ для (изо)бутанола составляет $= 74/180 = 0,411$ г (изо)бутанола/г глюкозы.

Для молочной кислоты выход ферментации для гомомолочнокислой ферментации составляет 2 моль молочной кислоты (М.м. = 90 г/моль) на моль глюкозы. В соответствии с этой стехиометрией, $Y_{ps\ max} = 1$ г молочной кислоты/г глюкозы.

Для других продуктов ферментации можно провести подобные расчеты.

Снижение затрат, достигаемое с применением целлюлолитических ферментов из *Rasamsonia*, обеспечивает уменьшение общего времени процесса.

Компенсация низкой дозировки фермента с увеличением времени гидролиза с применением ферментов *Rasamsonia*

Благодаря высокой стабильности стабильных ферментов, активность не исчезает со временем, хотя высвобождается меньше сахаров в ходе гидролиза. Можно снизить дозировку фермента и продлить применение фермента путем увеличения времени гидролиза для получения сходных уровней высвобождающихся восстанавливающих сахаров. Например, 0,175 мл фермента/г сухого вещества сырьевого материала приводит к высвобождению примерно 90% от теоретического максимума восстанавливающих сахаров из предварительно обработанного сырьевого материала за 72 часа. При использовании 0,075 мл фермента/г сухого вещества сырьевого материала примерно 90% превращение от теоретического максимума достигается в пределах 120 часов. Результаты показывают, что благодаря стабильности ферментативной активности, снижение дозировки фермента можно компенсировать путем увеличения времени гидролиза для получения одного и того же количества восстанавливающих сахаров. То же самое справедливо для гидролиза предварительно обработанного сырьевого материала при содержании сухого вещества выше 10%, что показывает компенсаторный эффект удлинения времени гидролиза при 15% сухого вещества сырьевого материала.

Снижение затрат на производство, достигаемое путем применения целлюлолитических ферментов, таких как *Rasamsonia*, приводит к необходимой сниженной дозировке фермента, обеспечивая сходный выход при гидролитическом превращении.

Снижение риска контаминации со стабильными ферментами

В общем способе превращения лигноцеллюлозного материала в этанол этапы способа предпочтительно осуществляют в септических условиях для снижения затрат на производство. Таким образом, возможна контаминация и рост контаминирующих микроорганизмов, что может привести к нежелательным побочным эффектам, таким как выработка молочной кислоты, муравьиной кислоты и уксусной кислоты, потери выхода этанола на субстрате, выработка токсинов и экстрацеллюлярных полисахаридов, что может оказывать значительное влияние на затраты на производство. Высокая температура процесса и/или короткое время процесса ограничивает риск контаминации при гидролизе и ферментации. Термостабильные ферменты, такие как из *Rasamsonia*, способны к гидролизу лигноцеллюлозного сырьевого материала при температурах выше 60°C. При этих температурах риск контаминации микроорганизмами, вызывающими нежелательные побочные эффекты, является слабым или почти нулевым.

Во время этапа ферментации, при котором образуется этанол, температура, как правило, составляет от 30 до 37°C и предпочтительно не повышается из-за потерь продукции. При использовании как можно более короткого времени ферментации риски и

эффекты контаминации и/или роста контаминантов как можно более снижаются. Со стабильными ферментами, такими как из *Rasamsonia*, можно применять как можно более короткое время ферментации (см. описание выше), и таким образом, риски контаминации и/или роста контаминантов как можно больше снижаются. Таким образом, снижение затрат на производство, достигаемое с применением термостабильных целлюлолитических ферментов из *Rasamsonia*, приводит к снижению риска нарушений процесса из-за контаминации.

Стабильные ферменты позволяют снизить затраты на охлаждение и повышают производительность выработки этанола

На первом этапе после термической обработки необходимо охладить предварительно обработанный сырьевой материал до температур, где ферменты имеют оптимальную активность. В большом масштабе это, как правило, выполняют путем добавления (охлажденной) воды, которая, помимо снижения температуры, снижает содержание сухого вещества. С применением термостабильных ферментов, таких как из *Rasamsonia*, можно достичь снижения затрат на производство благодаря тому, что (i) требуется меньшее охлаждение предварительно обработанного сырьевого материала, поскольку более высокие температуры допускаются при гидролизе, и (ii) добавляют меньше воды, что повышает содержание сухого вещества при гидролизе и ферментации, и таким образом, повышает производственный потенциал для этанола (количество, произведенное в единицу времени по объему) для завода по производству этанола. Кроме того, с применением термостабильных ферментов в соответствии с настоящим изобретением, таких как из *Rasamsonia*, можно достичь снижения затрат на производство путем применения охлаждающей воды, имеющей более высокую температуру, чем вода, используемая в способе с нетермостабильным ферментом.

Повторное использование ферментов после гидролиза со стабильными ферментами

В конце гидролиза активность ферментов становится низкой, поскольку высвобождается мало восстанавливающих сахаров из-за превращения почти всей целлюлозы. Однако количество присутствующей ферментативной активности мало снижается, предположительно, главным образом из-за абсорбции ферментов на субстрате. С помощью применения отделения твердого вещества от жидкости, такого как центрифугирование, фильтрация, осаждение с декантацией, и т.д., можно выделить 60% или больше, например, 70% ферментативной активности в растворе, и повторно применить для гидролиза нового предварительно обработанного лигноцеллюлозного сырьевого материала при последующем гидролизе.

Далее, после разделения твердого вещества и жидкости фермент в растворе можно

отделить от раствора, содержащего восстанавливающие сахара и другие продукты гидролиза от ферментативной активности. Это отделение можно выполнить путем (ультра- и микро)фльтрации, центрифугирования, осаждения с декантацией, седиментации, с первой абсорбцией фермента на носителе любого вида, или без неё, но не ограничиваясь ими.

Например, после гидролиза предварительно обработанного сырьевого материала с ферментативной нагрузкой 0,175 мл/г сухого вещества сырьевого материала в течение 20 часов, высвобождается 50% от теоретического максимального количества восстанавливающих сахаров, а после того же гидролиза в течение 72 часов высвобождается 90% от теоретического максимального количества восстанавливающих сахаров. Путем центрифугирования и ультрафльтрации извлекали 60-70% ферментативной активности в концентрате, в то время как фильтрат содержал более 80% высвобожденных восстанавливающих сахаров. Путем повторного применения концентрата, как такового или после дополнительной очистки и/или концентрирования, дозировку фермента во время следующего этапа гидролиза можно снизить от 60 до 70%. Снижение затрат, достигаемое с этими стабильными целлюлолитическими ферментами, такими как из *Rasamsonia*, обеспечивается таким способом за счет снижения необходимой дозировки фермента.

Повторное использование ферментов после гидролиза в комбинации с продукцией ферментов и повторным использованием дрожжевых клеток со стабильными ферментами

Способ, включающий повторное применение ферментов после гидролиза, как описано выше, можно объединить с повторным применением микроорганизмов, вырабатывающих этанол, после ферментации, и с применением фильтрата, содержащего восстанавливающие сахара, в качестве субстрата (очищенного и/или концентрированного или разбавленного) в ферментации с выработкой фермента и в качестве субстрата для культивирования микроорганизма, вырабатывающего этанол.

Повторное применение ферментов после вакуумной дистилляции со стабильными ферментами

Термостабильность ферментов, таких как из *Rasamsonia*, обеспечивает оставшуюся целлюлолитическую активность после гидролиза, ферментации и вакуумной дистилляции в отфильтрованной барде. Общая активность фермента снижается во время трех последующих этапов процесса. Таким образом, отфильтрованную барду, полученную после вакуумной дистилляции, можно повторно использовать в качестве источника ферментов для нового цикла процесса гидролиза-ферментации-дистилляции для превращения предварительно обработанной пшеничной соломы в этанол.

Отфильтрованную барду можно применять в концентрированной или (не)разбавленной форме и/или очищенной с добавлением дополнительных ферментов, или без них.

Повторное применение ферментов в комбинации с добавлением ферментов после вакуумной дистилляции с термостабильными ферментами

В оптимальном способе количество фермента, добавляемое в отфильтрованную барду перед её повторным применением в новом цикле процесса, равно количеству активности, потерянной на трех последовательных этапах процесса из предыдущего цикла процесса. Таким способом предотвращается избыточная дозировка фермента, и таким образом, достигается наиболее эффективное применение фермента.

Далее, путем обеспечения высокой дозировки фермента в первом производственном цикле и добавления фермента, равного количеству активности, потерянной во время трех последовательных этапов процесса в следующих циклах процесса, можно достичь наиболее высоких возможных скоростей гидролиза в каждом цикле процесса, что приводит к короткому времени гидролиза меньше 48 часов в комбинации с наиболее эффективным применением ферментов.

Применение стабильных ферментов в смешанных системах

За счет применения перемешивания во время гидролиза, ферменты чаще приходят в контакт с субстратами, что приводит к более эффективному применению каталитической активности. Это обеспечивает применение меньших дозировок ферментов и таким образом, к снижению затрат, если только смешивание не оказывает отрицательного влияния на ферменты. Стабильные ферменты, такие как термостабильные ферменты из *Rasamsonia*, устойчивы и могут выдерживать условия (местные) высокого сдвига и температур, которые отмечаются в случае интенсивного перемешивания суспензий. Применение систем с перемешиванием, таким образом, является благоприятным, и приводит к уменьшению дозировки, и таким образом, к снижению затрат.

Изобретение далее описано посредством следующих примеров, которые не следует считать ограничивающими объем изобретения.

Примеры

Информация об эксперименте

Штаммы

Подходящими штаммами *Rasamsonia*, которые можно использовать в представленных примерах для демонстрации эффекта и преимуществ изобретения, являются, например, ТЕС-101, ТЕС-147, ТЕС-192, ТЕС-201 или ТЕС-210. Штаммы описаны в WO 2011/000949.

Приготовление предварительно обработанного кислотой субстрата из кукурузной соломы

Предварительно обработанную разбавленной кислотой кукурузную солому (кКС) получали, как описано в Schell, D.J., *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2003), vol. 105-108, pp 69-85. Использовали реактор для предварительной обработки в пилотном масштабе, работающий в условиях равновесного состояния 190°C, с продолжительностью пребывания 1 мин и эффективной концентрацией H₂SO₄ 1,45 масс.% в жидкой фазе.

Анализы для определения белка

1. Общий белок

ТХУ Биурет

Способ является комбинацией осаждения белка с применением трихлоруксусной кислоты (ТХУ) для удаления мешающих веществ и обеспечения определения концентрации белка с колориметрической биуретовой реакцией. В биуретовой реакции ион меди (II) восстанавливается до иона меди (I), который образует комплекс с азотами и углеродами пептидных связей в щелочном растворе. Фиолетовая окраска указывает на присутствие белков. Интенсивность окраски, и следовательно, поглощение при 546 нм, прямо пропорциональны концентрации белка, в соответствии с законом Ламберта-Бера. Калибровку проводили с применением БСА (бычьего сывороточного альбумина), и содержание белка выражали в грамм белка в виде эквивалента БСА/л или в мг белка в виде эквивалента БСА/мл. Содержание белка рассчитывали с применением стандартных протоколов, известных в данной области техники, путем построения кривой значений ОП₅₄₆ против концентрации образцов с известной концентрацией, с последующим расчетом концентрации неизвестных образцов, с применением уравнения, полученного из калибровочной кривой.

2. Индивидуальные белки с применением ПАГЭ

Предварительная обработка образцов для ДСН-ПАГЭ

На основе установленной концентрации белка в образцах, проводили следующую подготовку образцов. К 10 мкл образца добавляли 40 мкл воды MilliQ и 50 мкл ТХУ (20%) для пятикратного разбавления образца (~ 1 мг/мл) и осаждения белков. Спустя 1 час инкубации на льду образцы центрифугировали (10 минут, 14000 об./мин). Осадок промывали 500 мкл ацетона и центрифугировали (10 минут, 14000 об./мин). Осадок обрабатывали, как описано ниже.

ДСН-ПАГЭ

Осадок растворяли в 65 мкл воды MilliQ, 25 мкл NuPAGE™ LDS буфера для образцов (4x) Invitrogen и 10 мкл NuPAGE™ восстанавливающего агента для образцов

(10x) Invitrogen. Перед этапом денатурации образец разбавляли в 5 раз с применением смеси MilliQ; NuPAGE™ LDS буфера для образцов и 10 мкл NuPAGE™ восстанавливающего агента для образцов в отношении 65:25:10. После смешивания образцы инкубировали в термомиксере в течение 10 минут при 70°C. Растворы образцов вносили на 4-12% Bis-Tris гель (NuPAGE™ BisTris, Invitrogen). На гель также наносили образец маркера (10 мкл) M12 (Invitrogen). Электрофорез в гелях проводили при 200 В в течение 50 минут, с применением XCELL Surelock, с 600 мл разбавленного в 20 раз ДСН буфера во внешней буферной камере и 200 мл разбавленного в 20 раз ДСН буфера, содержащего 0,5 мл антиоксиданта (NuPAGE™ Invitrogen), во внутренней буферной камере. После электрофореза гель дважды промывали деминерализованной водой, фиксировали гели раствором 50% метанола/7% уксусной кислоты в течение 1 часа, и окрашивали Sypro Ruby (50 мл на гель) в течение ночи. Изображение получали с применением Typhoon 9200 (610 ВР 30, Зеленый (532 нм), РМТ 600V, 100 микрон) после отмывания геля водой MilliQ.

Количественный анализ белка

С применением сканера Typhoon определяли отношение между белковыми полосами дорожки с применением стандартных способов, известных в данной области техники. Образец наносили в трех повторностях, и уровень яркости определяли с применением программы Image Quant. Значения выражали в виде процентного количества белка по отношению к общему белку, при расчете с применением уровня яркости избранной белковой полосы относительно общего уровня яркости всех белковых полос.

Расчет превращения глюкозана:

Превращение глюкозана (%) = (глюкоза (г/л) x 100 %) / (глюкан (фракция по сухому веществу) x СВ (г/кг) x 1,1); где:

Глюкоза (г/л) = концентрация глюкозы в надосадочной жидкости после гидролиза.

Глюкан (фракция по СВ) = содержание глюкозана в субстрате перед предварительной обработкой.

СВ (г/кг) = содержание сухого вещества при гидролизе (например, 20% СВ = 200 г/кг).

1,1 = увеличение массы из-за встраивания воды при гидролизе.

Примерный расчет:

Глюкоза = 60 г/л

Глюкановая фракция = 0,40 (40% по сухому веществу)

СВ = 200 г/кг

Пример превращения глюкозана = $(60 \cdot 100) / (0,4 \cdot 200 \cdot 1,1) = 68\%$ превращение

Делали поправку на испарение, если необходимо. Концентрацию в надосадочной жидкости затем превращали в концентрацию на килограмм гидролизата.

Измерение глюкуроновой кислоты в гидролизатах биомассы посредством СВЭЖХ-МС/МС

Анализ основан на разделении глюконовой кислоты с СВЭЖХ колонкой и детекции посредством МС/МС (на основе отрицательной электрораспылительной ионизации). Для исключения ошибок, вызванных эффектами супрессии ионов, испарения и введения, использовали меченый внутренний стандарт, а именно $^{13}\text{C}_6$ -глюконовую кислоту.

Химикаты и эталонные соединения

Воду, используемую для подготовки образцов и СВЭЖХ-МС/МС, фильтровали посредством фильтра Millipore, 0,22 мкм. Ацетонитрил ВЭЖХ качества получали от Merck (Амстердам, Нидерланды). 0,1 об.% раствор муравьиной кислоты в воде и 0,1 об.% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле получали от Biosolve B.V. (Валкенсвард, Нидерланды). Эталонное соединение глюконовой кислоты получали от Sigma (Звейндрахт, Нидерланды). Меченая изотопом глюконовая кислота ($^{13}\text{C}_6$, использована в качестве внутреннего стандарта) была изготовлена по заказу Buchem B.V. (Апелдорн, Нидерланды).

Внутренний стандартный раствор

Маточный раствор готовили с использованием навески 10 мг $^{13}\text{C}_6$ -глюконовой кислоты, вносимой в 10 мл мерную колбу, с растворением в 10 мл воды (около 1 мг/мл). Из этого маточного раствора готовили рабочий раствор путем отбора пипеткой 100 мкл маточного внутреннего стандартного раствора и добавления 9,99 мл воды (концентрация около 10 мкг/мл).

Стандартные растворы

Маточный раствор глюконовой кислоты готовили путем приготовления навески 5 мг глюконовой кислоты и добавления 10 мл воды. Маточный раствор затем разбавляли путем отбора пипеткой 20 мкл маточного раствора и добавления 980 мкл воды (разведений 1, концентрация около 10 мг/мл). Другое разведение готовили, отбирая пипеткой 100 мкл из разведения 1 и добавляя 900 мкл воды (разведение 2, концентрация около 1 мг/мл). Калибровочную кривую строили для ВЭЖХ флаконов в соответствии с Таблицей 1 ниже.

Подготовка образцов

Размораживали гидролизаты биомассы, если необходимо, и разбавляли в 10 раз водой, путем разбавления 150 мкл образца в пробирке Эппендорф с 1350 мл воды, с

последующим центрифугированием при 13000 об./мин в течение 15 минут. Полученную надосадочную жидкость разбавляли в 50 раз водой путем отбора пипеткой 20 мкл надосадочной жидкости в ВЭЖХ флакон и добавления 100 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта и 880 мкл воды.

СВЭЖХ-МС/МС

Глюконовую кислоту анализировали в системе Waters UPLC iClass, состоящей из модуля Waters iClass Binary Solvent Manager и модуля Water iClass Sample Manager FTN, соединенных с масс-спектрометром Waters Xevo TQD (Waters, Милфорд, Массачусетс, США). Хроматографическое разделение проводили с колонкой Waters Acquity UPLC ВЕН С18 (150x2,1 мм, 1,8 мкм) с применением градиентной элюции (А) 0,1 об.% муравьиной кислоты в воде и (В) 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле в качестве мобильных фаз. 7 мин градиент начинали с 1 минуты при 99% (А) с последующим линейным снижением до 90% (А) за 2 минуты, затем промывали 20% (А) в течение 2 минут и повторно уравнивали 99% (А) в течение 2 минут. Скорость потока сохраняли 0,35 мл/мин, с применением вводимого объема 5 мкл, а температуру колонки устанавливали на 40°C.

Масс-спектрометр работал в режиме отрицательной ионизации. Обработку данных и интеграцию пиков проводили с применением программного обеспечения Masslynx 4.1 (Waters). Детекцию глюконовой кислоты и ¹³C₆-глюконовой кислоты проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MPM). Общие установки были следующими: капиллярное напряжение ЭРИ 2,0 кВ, напряжение на экстракторе 3,0 В, напряжение на конусе 30 В. Поток десольватационного газа (азота) составил 800 л/час с температурой, установленной на 350°C, поток конусного газа (азота) 50 л/час, а температура источника 150°C. Использовали следующие установки ММР: m/z глюконовой кислоты 195,0 → 129,0, продолжительность выдержки 0,1 сек, напряжение столкновения 2 В; m/z ¹³C₆-глюконовой кислоты 201,0 → 134,0, продолжительность выдержки 0,08 сек, напряжение столкновения 2 В.

Количественный анализ

Концентрацию глюконовой кислоты в г/л рассчитывали с применением линейной регрессии:

$$\text{Концентрация (г/л)} = ((\text{Площадь соединения}/\text{Площадь внутреннего стандарта}) - \text{сдвиг по оси}) \times 1000 (\text{фактор разбавления}) / (\text{тангенс угла наклона калибровочной кривой} \times 1000)$$

Расчетное количество глюконовой кислоты в г/л можно преобразовать в содержание глюконовой кислоты в граммах/килограммах глюкана в лигноцеллюлозном материале посредством следующих расчетов.

При использовании предварительно обработанной кислотой кукурузной соломы в концентрации 20 масс.% СВ, в конце гидролиза в течение 120 часов, при pH 4,5 и 62°C отмечается объем осадка 6% (нерастворимого) и объем надосадочной жидкости 94%. Надосадочная жидкость имеет плотность 1,07 кг/л, и содержание глюкоана 36%. Таким образом, предварительно обработанная кислотой кукурузная солома при концентрации 20 масс.% СВ содержала 72 г глюкоана на килограмм гидролизата.

Начиная, например, с 0,5 г/л глюконовой кислоты, это дает $0,5/1,07=0,47$ г глюконовой кислоты/кг надосадочной жидкости (1,07 является плотностью жидкости). Это соответствует $0,47 \times 0,94=0,44$ г глюконовой кислоты/кг гидролизата (фактор осадка 6% по причине нерастворимости). При использовании предварительно обработанной кислотой кукурузной соломы в концентрации 20 масс.% СВ это соответствует $0,44/0,072=6,1$ г глюконовой кислоты/кг глюкоана.

Пример 1

Применение кислорода во время гидролиза для контроля количества образующейся глюконовой кислоты

Оптимальный ферментативный гидролиз предварительно обработанной кукурузной соломы, содержащей 20% сухого вещества (содержащей 36% глюкоана по сухому веществу) при температуре реактора 60°C и pH 4,5 проводили при сохранении концентрации глюконовой кислоты от 0,7 до 1,5 г/л в надосадочной жидкости гидролизата путем добавления кислорода. Это соответствует 9,7-20,8 г глюконовой кислоты, продуцируемой на килограмм глюкоана во время гидролиза глюкоана. Гидролиз проводили в 2,5 мг/г СВ сырьевого материала ТЕС-20 целлюлазной ферментной композиции (или коктейля). ТЕС-210 производили в соответствии с процедурами инокуляции и ферментации, описанными в WO 2011/000949.

Пример 2

Применение кислорода во время гидролиза для контроля количества образующейся глюконовой кислоты

Ферментативный гидролиз проводили с применением сырьевого материала в виде предварительно обработанной кислотой кукурузной соломы (кКС) при концентрации 20 масс.% сухого вещества (СВ). Раствор сырьевого материала готовили путем разбавления концентрированной суспензии сырьевого материала водой. Доводили pH до 4,5 с 25 масс.% раствором NH₄OH. Ферментативный гидролиз проводили в масштабе 1 кг с применением 1,5 литрового реактора. Контролировали сохранение pH 4,5 и температуру 62°C. Растворенный кислород во время процесса контролировали посредством рециркуляции газа в свободном пространстве и дополнительного свежего воздуха

(содержащего 20-21% кислорода).

Перед добавлением ферментов проводили рециркуляцию газа свободного пространства при потоке газа 3 л/час с применением перистальтического насоса и распределителя. Благодаря тому, что сырьевой материал потребляет кислород при химической реакции, уровень РК достигает 0% РК в пределах одного часа, что приводит к анаэробному сырьевому материалу и полному истощению кислорода в свободном пространстве. Полученный инертный газ свободного пространства (свободный от кислорода) использовали во время всего гидролиза в качестве газа-носителя для вводимого свежего воздуха.

Затем целлюлазный ферментный коктейль ТЕС-210 добавляли к сырьевому материалу в дозе 3,75 мг (ТХУ белка)/г СВ. ТЕС-210 получали в соответствии с процедурами инокуляции и ферментации, описанными в WO 2011/000949. Общее время гидролиза составило 120 часов.

Свежий воздух вводили рециркуляционную линию инертного газа свободного пространства во время всего процесса гидролиза при потоке свежего воздуха 0 – 3 – 6 – 12 – 24 или 48 мл на килограмм реакционной смеси в час, соответственно, начиная прямо после добавления фермента. РК измеряли постоянно во всех экспериментах. Образцы извлекали в начале и в конце эксперимента для анализа глюкозы посредством ВЭЖХ.

Параллельный эксперимент проводили во встряхиваемом флаконе для определения максимального уровня гидролиза глюкана. Максимальный гидролиз определяли путем инкубации сырьевого материала при очень высокой дозировке фермента (50 мг (ТХУ белка)/г СВ) при схожих условиях (рН, температура и СВ) в избытке воздуха свободного пространства, содержащего кислород. Определение РК в каждом эксперименте постоянно показывало 0% РК. Это можно объяснить прямым потреблением кислорода после его переноса из потока содержащего кислород рециркулирующего газа в жидкую фазу в реакторе.

Результаты представлены в Таблице 2. Повышение продукции глюкозы рассчитывали путем вычитания концентрации глюкозы (в г/л) в начале гидролиза из концентрации глюкозы (в г/л) в конце гидролиза для каждого состояния (т.е. поток свежего воздуха (мл/кг/ч) 0 – 3 – 6 – 12 – 24 – 48 – 96) и деления соответствующих величин на величину, установленную, когда поток свежего воздуха (мл/кг/ч) составил 0 (эта величина признана 100%).

Эти данные ясно демонстрируют, что более высокие количества глюкозы образуются, когда количество формирующейся глюконовой кислоты в конце гидролиза, сохраняют выше 3 г/кг глюкана в лигноцеллюлозном материале.

Пример 3

Влияние глюконовой кислоты на ферментативный гидролиз лигноцеллюлозного сырьевого материала

20 грамм предварительно обработанной кукурузной соломы инкубировали в 50 мл аналитической пробирке Greiner в течение 50 часов при уровне сухого вещества 6 масс.%, рН 4,5 при 62°C в присутствии 5 мг целлюлазного ферментного коктейля ТЕС-210 на грамм сухого вещества и в присутствии 0, 2, 4, 6 или 8 г/л глюконовой кислоты для определения ингибирующего эффекта глюконовой кислоты в отношении гидролиза глюкана в лигноцеллюлозном сырьевом материале. Эксперимент проводили при максимальном насыщении кислорода.

Образцы отбирали спустя 50 часов инкубации, и образцы центрифугировали для дополнительного анализа в центрифужных пробирках Эппендорф 5810 в течение 8 минут при 4000 об./мин. Концентрацию глюкозы определяли в надосадочной жидкости каждого образца посредством ВЭЖХ с применением колонки Bio-Rad HPLC87H. Результаты показаны в таблице 3. Высвобождение глюкозы, как представлено в таблице 3, является прямой мерой ферментативного гидролиза (гидролиза глюкана). Уровень глюконовой кислоты 2 г/л в надосадочной жидкости соответствует 89 г/кг глюкана в лигноцеллюлозном материале. Его можно рассчитать, как описано выше, с плотностью 1,02 кг/л, фактором осадка 2% и содержанием глюкана 2,16 г глюкана/кг гидролизата.

Результаты ясно показывают, что более высокие концентрации глюконовой кислоты оказывают отрицательное влияние на гидролиз глюкана.

Таблица 1. Калибровочная кривая

Стандарт	Итоговая концентрация (мкг/мл)	Стандартный раствор, разведение 1, мкл	Стандартный раствор, разведение 2, мкл	Внутренний стандарт, рабочий раствор, мкл	Вода, мкл
Стандарт 1	~ 0,1		100	100	800
Стандарт 2	~ 0,2		200	100	700
Стандарт 3	~ 0,5	50		100	850
Стандарт 4	~ 1	100		100	800
Стандарт 5	~ 2	200		100	700
Стандарт 6	~ 5	500		100	400

Таблица 2. Влияние добавления кислорода на ферментативный гидролиз лигноцеллюлозного сырьевого материала.

Поток свежего воздуха (в мл/кг/ч)	Количество кислорода (вводимого со свежим воздухом, в ммоль/кг глюкозы/час)*	Глюконовая кислота (в г/кг глюкозы в лигноцеллюлозном материале)	Повышение продукции глюкозы (в %)
0	0	2,96	-
3	0,36	3,33	12,5
6	0,72	3,82	34
12	1,43	3,82	31
24	2,86	4,93	28
48	5,71	6,40	41
96	11,42	8,99	53

* Кислород = 24,5 л/моль при 25°C, а содержание глюкозы составляет 72 г/кг гидролизата

Таблица 3. Влияние глюконовой кислоты на ферментативный гидролиз.

Добавленная глюконовая кислота (в г/л)	Глюконовая кислота (в г/кг глюкозы в лигноцеллюлозном материале)	Высвобождение глюкозы (в %)
0	0	100
2	89	90
4	178	82
6	267	79
8	356	77

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения сахарного продукта из лигноцеллюлозного материала, включающий следующие этапы:

(a) предварительной обработки лигноцеллюлозного материала;

(c) ферментативного гидролиза подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала с применением ферментной композиции, включающей по меньшей мере две целлюлазы; где ферментная композиция по меньшей мере содержит ЛПМО,

где количество образованной глюконовой кислоты в конце ферментативного гидролиза путем окисления ЛПМО лигноцеллюлозного материала, содержащего целлюлозу и/или целлоолигосахариды, поддерживают от 3 до 80 г/кг глюкана, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, путем добавления подходящего количества кислорода после предварительной обработки и до и/или во время ферментативного гидролиза лигноцеллюлозного материала.

2. Способ приготовления продукта ферментации из лигноцеллюлозного материала, включающий следующие этапы:

(a) предварительной обработки лигноцеллюлозного материала;

(c) ферментативного гидролиза необязательно промытого и/или необязательно подвергнутого предварительной обработке лигноцеллюлозного материала с применением ферментной композиции, включающей по меньшей мере две целлюлазы; где ферментная композиция по меньшей мере содержит ЛПМО, и необязательно очистки гидролизованного лигноцеллюлозного материала,

(d) ферментации гидролизованного лигноцеллюлозного материала до получения продукта ферментации, и

(e) извлечения продукта ферментации;

где количество образованной глюконовой кислоты в конце ферментативного гидролиза путем окисления ЛПМО лигноцеллюлозного

материала, содержащего целлюлозу и/или целлоолигосахариды, поддерживают от 3 до 80 г/кг глюкозы, присутствующего в лигноцеллюлозном материале, путем добавления подходящего количества кислорода после предварительной обработки и до и/или во время ферментативного гидролиза лигноцеллюлозного материала.

3. Способ по п. 1 или 2, где предварительно обработанный лигноцеллюлозный материал промывают.

4. Способ по п. 2 или 3, где ферментацию проводят с помощью микроорганизма, способного к ферментации по меньшей мере одного C5 сахара.

5. Способ по п. 4, где микроорганизм относится к виду *Saccharomyces cerevisiae*, в котором выполнены генетические модификации.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где во время этапа (с) ферментативного гидролиза кислород добавляют в лигноцеллюлозный материал.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где кислород добавляют в форме пузырьков.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где реактор для ферментативного гидролиза имеет объем 1 м³ или больше.

9. Способ по п. 8, где реактор для ферментативного гидролиза имеет объем 10 м³ или более.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где время ферментативного гидролиза составляет от 5 до 150 часов.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где используемая ферментативная композиция сохраняет активность в течение 30 часов или больше.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где гидролиз проводят при температуре 45°C или больше, предпочтительно 50°C или больше, и еще более предпочтительно при температуре 55°C или больше.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где ферментная композиция получена из грибка, предпочтительно, микроорганизма из рода *Rasamsonia*,

либо ферментная композиция содержит грибковый фермент, предпочтительно фермент *Rasamsonia*.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где содержание сухого вещества на этапе гидролиза (с) составляет 10 масс.% или более, предпочтительно 14 масс.% или более, а более предпочтительно, составляет от 14 до 33 масс.%.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где ферментативный гидролиз происходит в реакторе для периодического, периодического с подпиткой и/или непрерывного культивирования.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где ферментная композиция находится в форме цельного ферментационного бульона грибка.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где кислород вводят в виде кислородсодержащего газа, такого как воздух.