

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037453**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.30

(21) Номер заявки
201890710

(22) Дата подачи заявки
2016.08.19

(51) Int. Cl. **C12P 19/02** (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C12P 19/12 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ОЧИСТКИ ГИДРОЛИЗАТА БИОМАССЫ**

(31) **15184893.4**

(32) **2015.09.11**

(33) **EP**

(43) **2018.09.28**

(86) **PCT/EP2016/069740**

(87) **WO 2017/042019 2017.03.16**

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

(72) Изобретатель:
**Цаврель Михаил, Денневальд
Даниелле, Хоффманн Филип (DE)**

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

(56) JP-A-2005229821
US-A1-2010159521
VISHNU MENON ET AL.: "Trends
in bioconversion of lignocellulose: Biofuels,
platform chemicals & biorefinery concept",
PROGRESS IN ENERGY AND COMBUSTION
SCIENCE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS,
AMSTERDAM, NL, vol. 38, no. 4, 14 February
2012 (2012-02-14), pages 522-550, XP028488763,
ISSN: 0360-1285, DOI: 10.1016/J.PECS.2012.02.002
[retrieved on 2012-02-21], the whole document
US-A1-2013295629

(57) Изобретение касается нового эффективного способа очистки гидролизата биомассы, очищенного гидролизата, получаемого с помощью способа изобретения, а также применения такого очищенного гидролизата в качестве среды для ферментации.

B1

037453

037453

B1

Изобретение касается нового эффективного способа очистки гидролизата биомассы, очищенного гидролизата, получаемого с помощью способа данного изобретения, а также применения такого очищенного гидролизата в качестве среды для ферментации.

Лигноцеллюлозная биомасса, образующаяся из остатков сельскохозяйственного производства, таких как жмых сахарного тростника, пшеничная солома, ячменная солома и другие содержащие сахараиды или полисахариды и белки материалы, представляет собой ценный источник не только очищенных сахараидов, таких как мономерные или димерные сахара, но также и других компонентов, таких как аминокислоты, белки и минеральные вещества.

На существующем уровне техники имеются различные способы отделения компонентов, таких как, в частности, сахар из сахарной свеклы и сахарного тростника. Растворы, образующиеся в результате обработки этих так называемых "субстратов первой генерации", обычно являются относительно чистыми сахарными растворами, применение которых вполне возможно в силу отсутствия при стандартных способах сколько-нибудь заметного воздействия на эффективность процесса. Напротив, растворы, являющиеся результатом гидролиза "субстратов второй генерации", основывающихся на сельскохозяйственных остатках, таких как выжимки сахарного тростника, солома пшеницы или ячменная солома, представляют собой сложные смеси белков, минеральных веществ и сахаров. Они также включают органические кислоты, окрашенные частицы, продукты разложения лигнина и другие примеси. Это делает такие гидролизаты второй генерации неподходящими для дальнейшей обработки, например, приготовления полимолочной кислоты из молочной кислоты. Существующие способы, предусматривающие использование гидролизатов такого типа, также серьезно страдают от засорения труб и трубопроводов, от обрастаний на мембранах и других частях используемых установок, что ведет к снижению эффективности процесса, требуя выполнения более частой чистки и замены узлов и, вследствие этого, к значительно более высоким производственным затратам.

Таким образом, имеется потребность в способе, допускающем приготовление гидролизата биомассы с высокой степенью очистки, содержащего при этом максимальное количество ценных соединений, таких как мономерные и димерные сахара, и лишь минимальные количества примесей. Такой способ увеличивает возможности для дальнейшей переработки и масштаб возможных применений такого гидролизата.

Основной целью настоящего изобретения является разработка способа очистки гидролизата биомассы, предназначенного для приготовления гидролизата, который не обладает недостатками способов, известных в существующем уровне техники.

Таким образом, в первом объекте данное изобретение обеспечивает способ очистки гидролизата биомассы, содержащий этапы:

- a) обеспечения гидролизата биомассы;
- b) доведения температуры гидролизата биомассы до температуры, выбираемой в диапазоне от 50 до 95°C;
- c) добавления к гидролизату биомассы по меньшей мере одной кислоты;
- d) твердо-жидкостного разделения смеси гидролизата биомассы и кислоты с получением твердой фазы и жидкой фазы;
- e) деионизации жидкой фазы кислотно-гидролизатной смеси после разделения согласно этапу d).

Авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что комбинация регулирования температуры и добавления кислоты - которая даже увеличивает ионное содержание раствора - ведет к улучшению последующей деионизации и, таким образом, к улучшению очистки гидролизата. Деионизация улучшается в двух аспектах: увеличивается количество солей, удаляемых в ходе деионизации, и снижается степень засорения в установке деионизации и в сопутствующих способу узлах. Следующее преимущество настоящего изобретения состоит в том, что данный способ также может применяться в случаях, когда гидролизат биомассы содержит органические кислоты. Термин "биомасса" при его использовании в настоящем изобретении относится к биомассе любого типа, известного специалистам в данной области в качестве подходящего для способа данного изобретения. Особенно предпочтительной является биомасса растительного происхождения. В рамках следующего предпочтительного воплощения исходное содержание сухого вещества биомассы выбирается в диапазоне от 10 до 100 мас.%, более предпочтительно от 35 до 95 мас.% и особенно предпочтительно от 40 до 80 мас.%. Термин "сухое вещество" (d.m.) относится к соотношению исходной биомассы и массы, определенной после удаления из свежей ткани воды и других летучих соединений с помощью ИК-весов. При этом особенно предпочтительным является такой выбор биомассы, при котором ее сухое вещество содержит по меньшей мере 25 мас.% сахараидов, таких как мономерные сахара, димерные сахара и олигосахариды и/или полисахариды, более предпочтительно по меньшей мере 40 мас.%, особенно предпочтительно по меньшей мере 60 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 80 мас.% сахараидов, таких как мономерные сахара, димерные сахара и олигосахариды и/или полисахариды. Кроме того, в объем термина "биомасса" должны быть включены любые смеси подходящих биомасс.

Особенно предпочтительной биомассой является "биомасса лигноцеллюлозы".

Термин "биомасса лигноцеллюлозы" относится к остаткам, отходам и/или побочным продуктам ле-

соводства и сельского хозяйства, пищевой и бумажной промышленности и к бытовым отходам. В частности, термин "биомасса лигноцеллюлозы" при его использовании в настоящем изобретении включает солому зерновых культур и/или спелты (например, пшеницы, ржи, ячменя, овса), кукурузную солому, материал грубых кормов для скота и/или длинностебельных растений, травы, такие как *Setaria lespedeza*, прутьевидное просо (*Panicum virgatum*), слоновая трава (мискантус; китайский тростник), суданская трава (*Sorghum sudanense*, *Sorghum drummondii*), *Arundo donax*, кору, древесину, древесные отходы, древесную щепу и/или стружку, плодовую мякоть, стебли риса, банановые листья, пустые фруктовые гроздья и отходы переработки агавы.

Кроме того, подходящую для данного способа биомассу дает стойловый навоз, травяные материалы, кофейный жмых и остатки масложитного производства, такие как прессованный жмых рапсового семени, а также стоки с мельниц, бумажная масса и сточные воды целлюлозно-бумажных комбинатов, макулатура, овощные и фруктовые отходы.

В одном предпочтительном воплощении способа настоящего изобретения биомасса выбирается из целлюлозы, гемицеллюлозы и/или лигнинсодержащей биомассы.

В одном особенно предпочтительном воплощении способа настоящего изобретения биомасса выбирается из свекловичного жома, жмыха сахарного тростника, соломы сахарной свеклы, соломы пшеницы, древесины и их смесей.

В другом особенно предпочтительном воплощении способа настоящего изобретения биомасса представляет собой лигноцеллюлозную биомассу из сельскохозяйственных отходов, таких как солома пшеницы, ячменная солома, соевая солома, жмых сахарного тростника, листья и стебли сахарного тростника, солома сахарного тростника, солома кукурузы, грубые корма для скота и их смеси.

Термин "гидролизат биомассы" при его использовании в настоящем изобретении должен пониматься как представляющий деполимеризованный полимер, подвернутый деполимеризации в результате реакции гидролиза. Под "реакцией гидролиза" подразумевается расщепление химических связей в результате добавления воды. Один способ осуществления гидролиза технически состоит в добавлении к биомассе ферментов, относящихся к классу гидролаз.

В одном предпочтительном воплощении гидролизат биомассы содержит по меньшей мере 50 мас.% сахаридов в форме мономерных и димерных сахаров, предпочтительно по меньшей мере 65 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 75 мас.%, также предпочтительно по меньшей мере 85 мас.% и наиболее предпочтительно 99 мас.% по отношению к сухому веществу (d.m.), биомассы. В следующем предпочтительном воплощении гидролизат биомассы содержит аминокислоты, олигопептиды, минеральные вещества, олигосахариды и/или белки, а также органические кислоты. Содержание минеральных веществ предпочтительно отвечает по меньшей мере 0,5 мас.% солей, предпочтительно по меньшей мере 1 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 2 мас.% и наиболее предпочтительно 3 мас.% по отношению к сухому веществу (d.m.) биомассы. Гидролизат биомассы может содержать органические кислоты, такие как муравьиная кислота, уксусная кислота, галактурононовая кислота и молочная кислота. Также он может содержать следующие продукты разложения: фенольные производные, такие как 4-гидрокси-3-метоксифенил и 4-гидрокси-3,5-диметоксифенил, феруловая кислота, леулиновая кислота, 4-гидроксibenзойная кислота, фурфуролы, 5-гидроксиметилфурфурол, таннины и терпены.

Гидролизат биомассы при его использовании со способом настоящего изобретения предпочтительно готовился согласно следующим методикам.

Предпочтительным является обеспечение биомассы в форме твердых частиц, получаемых, например, нарезанием, дроблением, размолотом, стрижкой, измельчением под действием сдвига, нарубанием, диспергированием и/или смешиванием биомассы до этапа (а). В следующем воплощении биомасса может быть подвергнута процессу предварительной подготовки.

Способы, подходящие для предварительной обработки биомассы, включают любые виды механических, биологических, химических и/или физических способов предварительной обработки, известные специалистам в данной области. В одном предпочтительном воплощении способ предварительной обработки выбирается из способов тонкого механического измельчения, обработки с кислотами и/или щелочами, влажного окисления, рН-контролируемого гидротермолиза и/или обработки паровым взрывом.

"Обработка паровым взрывом" предпочтительно содержит выполняемую под давлением при температуре от 60 до 350°C, предпочтительно от 80 до 300°C, особенно предпочтительно от 100 до 250°C и наиболее предпочтительно от 110 до 220°C гидротермальную обработку содержащего лигноцеллюлозу материала в присутствии или отсутствии кислотных (таких как H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4) или основных/щелочных (т.е. NH_4OH , $NaOH$, KOH , известь) катализаторов, которые добавляются (в случае их применения) в концентрациях от 0,01 до 15 мас.%, предпочтительно от 0,05 до 12,5 мас.%, более предпочтительно от 0,1 до 10 мас.% и наиболее предпочтительно от 0,25 до 7,5 мас.%. В одном предпочтительном воплощении величина давления предпочтительно выбирается из 1 до 100 бар, предпочтительно от 2 до 50 бар, также предпочтительно от 3 до 25 бар и наиболее предпочтительно от 5 до 15 бар. Для обеспечения эффективного преобразования компонентов биомассы при подготовке к ферментативному гидролизу длительность времени протекания реакции в ходе обработки паровым взрывом должна выби-

раться от 10 с до 2 ч, предпочтительно от 1 мин до 1,5 ч и наиболее предпочтительно от 5 мин до 1 ч. В одном особенно предпочтительном воплощении предварительная обработка с "тонким механическим измельчением" содержащего лигноцеллюлозу материала выполняется перед или в ходе предварительной обработки паровым взрывом при том, что тонкое механическое измельчение выбирается из группы, состоящей из механической обработки, толчения, нарубания, дробления, нарезания, облучения, размола и их комбинаций.

"Кислотная предварительная обработка" предпочтительно представляет собой обработку непрерывно разбавляемой и/или слабой кислотой, такую как обработка с серной кислотой, или же с другой органической кислотой, такой как уксусная кислота, муравьиная кислота, молочная кислота, фосфорная кислота, азотная кислота, лимонная кислота, винная кислота, янтарная кислота, хлористоводородная кислота или их смеси. Также могут использоваться и другие кислоты. "Обработка слабой кислотой" должна пониматься как выполняемая при pH от 0,1 до 5, предпочтительно при pH от 2 до 3. В одном предпочтительном воплощении кислота добавляется в концентрациях от 0,01 до 15 мас.%, предпочтительно от 0,05 до 12,5 мас.%, более предпочтительно от 0,1 до 10 мас.% и наиболее предпочтительно от 0,25 до 7,5 мас.%. Предпочтительно такая кислота является серной кислотой. Кислота может приводиться в контакт с биомассой при температуре в диапазоне от 120 до 280°C, предпочтительно от 135 до 225°C и наиболее предпочтительно от 150 до 200°C в течение периода времени от 1 до 60 мин, предпочтительно от 2 до 30 мин и наиболее предпочтительно от 5 до 15 мин. В особенно предпочтительных воплощениях в целях удаления гемицеллюлозы может применяться добавление сильных кислот, таких как серная кислота.

"Химическая предварительная обработка" также относится к обработке биомассы с помощью H_2O_2 , озона, кислот Льюиса, $FeCl_3$, $Al_2(SO_4)_3$ в водных растворах спиртов, глицерина, диоксана, фенола, этиленгликоля, $NaOH$, Na_2CO_3 и/или аммиака. Предпочтительные концентрации, температура и длительность выбираются аналогично условиям, приведенным выше в отношении кислотной предварительной обработки.

"Предварительная обработка с влажным окислением" включает применение окислителей, таких как окисляющие агенты на сульфитной основе.

Термин "тонкое механическое измельчение" относится к любой механической обработке, которая активизирует разделение и/или высвобождение из биомассы целлюлозы, гемицеллюлозы и/или лигнина.

Тонкое механическое измельчение предпочтительно выбирается из группы, состоящей из механической обработки, толчения, нарубания, дробления, нарезания, облучения, размалывания, такого как сухой размол, мокрый размол и вибрационный размол в шаровой мельнице, а также их комбинаций.

Термин "биологическая предварительная обработка" относится к любой предварительной биологической обработке, которая способствует разделению и/или высвобождению из биомассы целлюлозы, гемицеллюлозы и/или лигнина. Биологические методики предварительной обработки могут включать применение солубилизирующих лигнин микроорганизмов, таких как актиномицеты (например, штаммы *Streptomyces*) или грибы белой гнили.

Описанные выше способы предварительной обработки должны осуществляться в подходящих устройствах, известных специалистам в данной области. Устройство, подходящее для выполнения предварительной химической обработки, может быть емкостью любого типа, такой как корпусной реактор или реактор с механическим перемешиванием. Устройство, подходящее для выполнения обработки паровым взрывом, может быть емкостью любого типа, такой как корпусной реактор или реактор с механическим перемешиванием, но она также может проводиться в шнековом реакторе, предпочтительно шнековом реакторе непрерывного действия, или в химическом реакторе идеального вытеснения, предпочтительно в химическом реакторе идеального вытеснения непрерывного действия.

Содержание сухого вещества в прошедшей предварительную обработку биомассе предпочтительно выбирается от 20 до 60 мас.%, особенно предпочтительно от 35 до 50 мас.%, при том что наиболее предпочтительно, чтобы биомасса была предварительно обработана способом, не включающим добавление какой-либо кислоты и/или щелочи.

При этом одно особое преимущество данного способа гидролиза биомассы состоит в том, что использование относительно крупных и/или не подвергнутых предварительной обработке частиц биомассы также будет обеспечивать достижение благоприятных результатов. Размер частиц биомассы предпочтительно является таким, чтобы по меньшей мере 90 мас.% частиц имели максимальную длину 200 мм, более предпочтительно 100 мм, еще более предпочтительно 50 мм и наиболее предпочтительно 25 мм. Более предпочтительно, чтобы размер частиц биомассы предпочтительно был таким, чтобы по меньшей мере 95 мас.% частиц имели максимальную длину 200 мм, более предпочтительно 100 мм, еще более предпочтительно 50 мм и наиболее предпочтительно 25 мм.

Предварительно обработанная биомасса затем предпочтительно приводится в контакт с ферментной композицией, содержащей по меньшей мере один фермент, выбранный из класса гидролитических ферментов.

Термин "приведение в контакт" (или "приведенный в контакт") содержит любой вид введения биомассы в контакт с композицией фермента, известный специалистам в данной области в качестве подхо-

дящего для способа данного изобретения. В одном предпочтительном воплощении "приведение в контакт" биомассы с композицией фермента выполняется посредством добавления композиции фермента к биомассе. Кроме того, особенно предпочтительно, чтобы добавление композиции фермента сопровождалось или выполнялось одновременно со смешиванием композиции фермента и биомассы.

Термин "композиция фермента" относится к любой композиции, содержащей по меньшей мере один фермент, выбираемый из класса гидролитических ферментов. Количество по меньшей мере одного фермента, выбираемого из класса гидролитических ферментов, предпочтительно составляет от 1 до 99,99 мас.% (относительно массы композиции фермента), более предпочтительно от 5 до 99 мас.%, особенно предпочтительно от 10 до 95 мас.% и наиболее предпочтительно от 20 до 90 мас.% и может, кроме того, содержать по меньшей мере один фермент, выбираемый из класса лиаз. В тех воплощениях, где ферментная композиция содержит по меньшей мере один фермент, выбранный из класса лиаз, содержание по меньшей мере одного фермента, выбираемого из класса гидролитических ферментов, предпочтительно составляет от 0,01 до 50 мас.% (относительно массы ферментной композиции), предпочтительно от 0,05 до 20 мас.%, более предпочтительно от 0,08 до 5 мас.% и наиболее предпочтительно от 0,1 до 1 мас.%.

В одном предпочтительном воплощении ферментная композиция содержит целлюлазы, гемицеллюлазы и/или пектиназы.

В одном особенно предпочтительном воплощении ферментная композиция содержит по меньшей мере одну целлюбогидролазу (ЕС 3.2.1.-) и по меньшей мере одну эндо-4-β-глюканазу (ЕС 3.2.1.4).

В одном особенно предпочтительном воплощении ферментная композиция содержит по меньшей мере одну целлюбогидролазу (ЕС 3.2.1.-), по меньшей мере одну эндо-4-β-глюканазу (ЕС 3.2.1.4), по меньшей мере одну β-глюкозидазу (ЕС 3.2.1.4), по меньшей мере одну гликозидгидралазу 61 (GH61 и СВМ33), по меньшей мере одну эндоксилазу (ЕС 3.2.1.8) и по меньшей мере одну β-ксилозидазу (ЕС 3.2.1.37).

В одном особенно предпочтительном воплощении указанная выше ферментная композиция содержит, кроме того, один или несколько ферментов, выбираемых из β-глюканазы (ЕС 3.2.1.-), ацетилксила-нэстеразы (ЕС 3.1.1.72), ацетилгалактанэстеразы (3.1.1.6)), α-арабинопиранозидазы (3.2.1.-), α-галакто-зидазы (ЕС 3.2.1.22), β-галактозидазы (ЕС 3.2.1.23), α-глюкуронидазы (ЕС 3.2.1.139), β-манназы (ЕС 3.2.1.78), пектинметилэстеразы (ЕС 3.1.1.11), пектинацетилэстеразы (ЕС 3.1.1.-), рамногалактуроназы (ЕС 3.2.1.-; GH28), рамногалактуронанацетилэстеразы (ЕС 3.1.1.86), рамногалактуронанэндолиазы (ЕС 4.2.2.23), рамногалактуронанлиазы (ЕС 4.2.2.-) и из β-маннозидаз (ЕС 3.2.1.25), полигалактуроназ (ЕС 3.2.1.15, 67, 82; GH28) и пектин/пектат лиаз (ЕС 4.2.2.2, 6, 9, 10).

Термины "целлюлазы", "гемицеллюлазы" и "пектиназы" относятся к любой смеси ферментов, которая вовлечена в гидролитическое разложение (деполимеризацию) полимерной целлюлозы, гемицеллюлозы и/или пектина до мономерных сахаров. В данном контексте термины "целлюлазы", "гемицеллюлазы" и "пектиназы" относятся к смесям как естественного, так и искусственного происхождения, которые включают множество ферментов, вырабатываемых живыми организмами, такими как, например, филаментные грибки. "Целлюлазы", "гемицеллюлазы" и "пектиназы" предпочтительно выделяются из грибов, таких как входящие в подгруппы Eumycota и Oomycota, включая, но не ограничиваясь следующими родами: *Aspergillus*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Cephalosporium*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochiobolus*, *Cryptococcus*, *Cyathus*, *Endothia*, *Endothia mucor*, *Fusarium*, *Gilocladium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Myceliophthora*, *Myrothecium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Phanerochaete*, *Podospora*, *Paecilomyces*, *Pyricularia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Schizophyllum*, *Stagonospora*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Thermomyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyocladium*, *Trichophyton* и *Trametes*. В одном предпочтительном воплощении филаментные грибки представлены видами, принадлежащими к роду *Trichoderma*.

В одном предпочтительном воплощении ферментной композиции целлюлазы и/или пектиназы имеют происхождение из грибкового источника. В одном особенно предпочтительном воплощении ферментной композиции этот грибковый источник представлен *Trichoderma reesei*.

Термин "смесь ферментов" предпочтительно относится к смеси ферментов, секретируемых одним или несколькими микробиологическими источниками. В некоторых воплощениях ферменты, предназначенные для применения в этой ферментативной смеси (смесях), могут быть приготовлены из одного или нескольких штаммов филаментных грибов естественного или искусственного происхождения. Предпочтительные штаммы перечислены выше. Желательное соотношение ферментативных компонентов в конечной смеси (смесях) может быть достигнуто посредством изменения относительного количества фермента в конечной смеси, например, добавкой очищенного или частично очищенного фермента (ферментов). В некоторых воплощениях для улучшения разложения целлюлозного субстрата в сбраживаемые сахара конечная смесь (смеси) может дополняться одной или несколькими ферментативными активностями, которые эндогенно не экспрессируются или экспрессируются филаментными грибами на относительно низком уровне. Дополнительный фермент(ы) может быть добавлен в качестве дополнения к конечной смеси(ям), и ферменты могут быть компонентом отдельного общего ферментативного бульона или же могут быть очищены либо в минимальной степени извлечены и/или очищены.

Термин "целлюлаза" относится к любому ферменту, способному гидролизовать полимеры целлю-

лозы до более коротких олигомеров и/или глюкозы. Предпочтительные для применения в ферментной композиции целлюлазы включают целлобигидролазы (СВН) (ЕС 3.2.1.-), эндо-1,4-β-глюканазы (EG) (ЕС 3.2.1.4), β-глюкозидазу (ЕС 3.2.1.4), целлобиозгидролазу (ЕС 3.2.1.21), гликозидгидролазу 61 (GH61 и СВМ33), экспансии, сволленин, лузинин и СР-белки (ЕС 3.1.1.-; СЕ15).

Термин "гемицеллюлаза" относится к любому ферменту, способному к расщеплению или содействующему расщеплению гемицеллюлозы. Предпочтительные в данной ферментной композиции гемицеллюлазы включают β-глюканазы (ЕС 3.2.1.-), эндоксилазы (ЕС 3.2.1.8), β-ксилозидазы (ЕС 3.2.1.37), ацетилксилаанэстеразу (ЕС 3.1.1.72), ацетилгалактанэстеразу (3.1.1.6), ацетилманнанэстеразу, ферулоилэстеразу (ЕС 3.1.1.73), глюкуронилэстеразу (ЕС 3.1.1.-), α-L-арабинофуранозидазу (ЕС 3.2.1.55), α-арабинопиранозидазу (3.2.1.-), α-галактозидазу (ЕС 3.2.1.22), β-галактозидазу (ЕС 3.2.1.23), α-глюкуронидазы (ЕС 3.2.1.139), β-манназу (ЕС 3.2.1.78), β-маннозидазы (ЕС 3.2.1.25), маннан-1,4-маннобиозидазу (ЕС 3.2.1.100), арабиногалактанэндо-β-1,4-галактаназу (ЕС 3.2.1.89), эндо-β-1,3-галактаназу (ЕС 3.2.1.90), галактанэндо-β-1,3-галактаназу (ЕС 3.2.1.181, глюкуроноарабиноксиланэндо-1,4-β-ксилаазу (ЕС 3.2.1.136), α-L-фукозидазу (ЕС 3.2.1.51), кониферин-β-глюкозидазу (ЕС 3.2.1.126), ксилоглюкангидролазы (ЕС 3.2.1.150, 151, 155), ксилан-α-1,2-глюкуронидазу (ЕС 3.2.1.131), эндоксилогалактуронангидролазу (ЕС 3.2.1.-; GH28), α-амилазу (ЕС 3.2.1.1), глюкан-1,4-α-глюкозидазу (ЕС 3.2.1.3), галактан-1,3-галактозидазы (GH43), 1,4-эндогалактаназу (ЕС 3.5.1.89; GH53), α-рамнозидазу (ЕС 3.2.1.40), β-рамнозидазу (ЕС 3.2.1.43), лигнинпероксидазу (ЕС 1.11.1.14), Mn-пероксидазу (ЕС 1.11.1.13), арилалкогольоксидазу (ЕС 1.1.3.7), глиоксальоксидазу (ЕС 1.1.3.), карбогидратоксидазы (ЕС 1.1.3.4,9,10), лакказы (ЕС 1.10.3.2) и целлобиоздегидрогеназу (ЕС 1.1.99.18).

Термин "пектиназа" относится к любому ферменту, способному к расщеплению или содействующему расщеплению пектина. Предпочтительные для ферментной композиции пектиназы включают полигалактуроназы (ЕС 3.2.1. 15,67,82; GH28), пектин/пектатлиазы (ЕС 4.2.2.2,6,9,10), пектинметилэстеразу (ЕС 3.1.1.11), пектинацетилэстеразу (ЕС 3.1.1.-), рамногалактуроназу (ЕС 3.2.1.-; GH28), рамногалактуронанцетилэстеразу (ЕС 3.1.1.86), рамногалактуронанэндолиазу (ЕС 4.2.2.23), рамногалактуронанлиазу (ЕС 4.2.2.-), рамногалактуронангалактуронгидролазу (ЕС 3.2.1.-), ксилогалактуронангидролазу (ЕС 3.2.1.-), пектинметилэстеразу (ЕС 3.1.1.11), β-арабинофуранозидазу (ЕС 3.2.1.55), β-1,4-галактаназу (ЕС 3.2.1.89), β-1,3-галактаназу (ЕС 3.2.1.90), β-галактозидазу (ЕС 3.2.1.23), α-галактозидазу (ЕС 3.2.1.22), ферулоилацетилэстеразу (ЕС 3.1.1.-), α-фукозидазу (ЕС 3.2.1.51), β-фукозидазу (ЕС 3.2.1.38), β-апиозидазу (ЕС 3.2.1.-), α-рамнозидазу (ЕС 3.2.1.40), β-рамнозидазу (ЕС 3.2.1.43), α-арабинопиранозидазу (ЕС 3.2.1.-), β-глюкуронидазу (ЕС 3.2.1.31), α-глюкуронидазу (ЕС 3.2.1.139), β-ксилозидазу (ЕС 3.2.1.37) и α-ксилозидазу (ЕС 3.2.1.x).

Ферменты классифицируются согласно номенклатурам, которые основываются либо на Номенклатуре и классификации ферментов Международного союза специалистов в области биохимии и молекулярной биологии (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>), либо на базе данных Carbohydrate-Active EnZYmes (<http://www.cazy.org/>).

Термин "активность" фермента относится к каталитической активности фермента в условиях, которые являются подходящими для того, чтобы данный фермент выступал в качестве белкового катализатора, преобразующего определенные полимерные или искусственные субстраты в определенные олигомерные или мономерные продукты. Термин "подходящие условия" в том смысле, в котором он используется в данном контексте, является хорошо известным и применимым специалистами в данной области.

"Приведение в контакт" может выполняться любым способом, известным специалистам в данной области в качестве подходящего для целей изобретения. В этой связи предпочтительно, чтобы ферментная смесь добавлялась к биомассе при перемешивании биомассы внутри емкости. Фермент(ы) также может быть иммобилизованным на материале-носителе.

В одном предпочтительном воплощении гидролиз биомассы выполняется в течение времени, достаточного для гидролиза по меньшей мере 20 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 30 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 50 мас.% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 60 мас.% биомассы. В следующем предпочтительном воплощении гидролиз биомассы выполняется в течение времени, достаточного для гидролиза от 10 до 100 мас.%, предпочтительно от 20 до 90 мас.%, еще более предпочтительно от 30 до 85,0 мас.% и наиболее предпочтительно от 40 до 75 мас.% целлюлозы биомассы. Термин "гидролизование" должен пониматься как отображающий гидролитическое преобразование нерастворимых полимерных компонентов биомассы в растворимые мономерные, димерные и/или олигомерные соединения под действием химических, физических и/или ферментативных процессов, таких как гидролиз.

В одном особенно предпочтительном воплощении гидролиз биомассы выполняется в течение времени от 1 мин до 136 ч, более предпочтительно от 30 мин до 112 ч, особенно предпочтительно от 1 до 100 ч, еще более предпочтительно от 4 до 96 ч, также особенно предпочтительно от 12 до 85 ч.

В следующем предпочтительном воплощении гидролиз биомассы выполняется до тех пор, пока содержание остающихся нерастворимых твердых частиц не становится менее 40 мас.%, предпочтительно

менее 30 мас.%, еще более предпочтительно менее 20 мас.% и наиболее предпочтительно менее 15 мас.%. В следующем предпочтительном воплощении гидролиз биомассы выполняется до тех пор, пока содержание остающихся нерастворимых твердых частиц не оказывается в пределах от 5 до 40 мас.%, предпочтительно от 8 до 30 мас.% и наиболее предпочтительно от 10 до 25 мас.%.

В еще одном предпочтительном воплощении гидролиз биомассы выполняется до тех пор, пока по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 60% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80% биомассы не переходит в жидкое состояние, при том что особенно предпочтительна степень ожигения от 60 до 90%.

Температура реакции в ходе гидролиза предпочтительно выбирается от 25 до 80°C, более предпочтительно выбирается от 30 до 75°C и особенно предпочтительно от 35 до 65°C. В другом предпочтительном воплощении гидролиз биомассы выполняется в течение времени от 1 до 120 ч, предпочтительно от 2 до 110 ч, более предпочтительно от 3 до 100 ч, при том что температура выбирается от 35 до 75°C или от 45 до 65°C.

В еще одном предпочтительном воплощении показатель pH в ходе гидролиза предпочтительно выбирается от 4 до 6,5, особенно предпочтительно от 4,5 до 5,5. Подходящие уровни дозировок и эксплуатационные режимы будут очевидны специалистам в данной области, в частности, в свете подробного представляемого здесь раскрытия. Оптимальные уровни дозировок будут в значительной степени варьировать в зависимости от субстрата и применяемых технологий предварительной обработки. Ферментная композиция предпочтительно добавляется к биомассе в количестве от 0,01 до 24 мас.% от сухого вещества биомассы, более предпочтительно от 0,025 до 12 мас.% от сухого вещества биомассы, особенно предпочтительно составляя от 0,05 до 6 мас.% от сухого вещества биомассы и наиболее предпочтительно от 0,1 до 3 мас.% от сухого вещества биомассы. Общая концентрация фермента (белок) определялась методом Брэдфорда с бычьим сывороточным альбумином в качестве эталонного стандарта (M., 1976).

Гидролиз биомассы выполняется в емкости любого типа, известного специалистам в данной области в качестве подходящего для способа данного изобретения, предпочтительно внутри реактора. Знания о подходящих реакторах находятся в пределах компетенции специалистов в данной области. Предпочтительные емкости/реакторы включают, но не ограничиваются емкостями/реакторами, содержащими средства для перемешивания и/или для перекачивания либо циркуляции содержимого биомассы внутри реактора. Кроме того, предпочтительные средства предпочтительных реакторов включают, но не ограничиваются средствами измерения температуры и/или pH и управления температурой и/или pH.

Согласно этапу b) способа данного изобретения температура гидролизата биомассы доводится до температуры, выбираемой в диапазоне от 50 до 95°C, предпочтительно в диапазоне от 60 до 90°C, более предпочтительно в диапазоне от 65 до 85°C. Такое регулирование должно выполняться любыми средствами, известными специалистам в данной области в качестве подходящих для способа изобретения.

В одном особенно предпочтительном воплощении этап b) способа данного изобретения выполняется в течение времени от 1 до 120 мин, предпочтительно от 2 до 90 мин и особенно предпочтительно от 3 до 75 мин, при том что также предпочтительными являются промежутки времени от 30 до 90 мин и от 45 до 75 мин.

Согласно этапу c) способа данного изобретения к гидролизату биомассы добавляется по меньшей мере одна кислота для получения кислотного-гидролизатной смеси. По меньшей мере одна кислота может быть органической или неорганической кислотой. В одном предпочтительном воплощении по меньшей мере одна кислота предпочтительно выбирается из группы, состоящей из серной кислоты, фосфорной кислоты, соляной кислоты, азотной кислоты, уксусной кислоты, муравьиной кислоты, молочной кислоты, галактуроновой кислоты, лимонной кислоты, янтарной кислоты и их смесей. В одном предпочтительном воплощении по меньшей мере одна кислота выбирается из кислоты с показателем pKa ниже 5,0, предпочтительно из кислот с величиной pKa ниже 3,5, т.е. предпочтительно с величиной pKa от -4,0 до 5,0 и наиболее предпочтительно от -3,0 до 5,0.

В следующем предпочтительном воплощении по меньшей мере одна кислота добавляется к гидролизату биомассы до достижения гидролизатом биомассы показателя pH от 1,5 до 4,5, предпочтительно от 2,0 до 4,0 и наиболее предпочтительно от 2,5 до 3,5.

В следующем предпочтительном воплощении температура выбирается в диапазоне от 65 до 85°C и pH в диапазоне от 2,0 до 3,5. В следующем предпочтительном воплощении температура увеличивается до 70°C и pH устанавливается равным 2,5.

В другом предпочтительном воплощении этапы b) и c) способа данного изобретения являются выполняемыми, по меньшей мере частично, одновременно. Таким образом, особенно предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна кислота добавлялась в процессе регулирования температуры гидролизата биомассы до температуры, выбираемой в диапазоне от 60 до 90°C, начиная от температуры 50°C, также предпочтительно начиная от температуры 60°C. Еще более предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна кислота добавлялась в процессе регулирования температуры гидролизата биомассы до температуры, выбираемой в диапазоне от 65 до 85°C, начиная от температуры 50°C, также предпочтительно начиная от температуры 60°C.

В другом предпочтительном воплощении температура по меньшей мере одной кислоты выбирается в диапазоне от 5 до 50°C, предпочтительно от 10 до 40°C и наиболее предпочтительно от 15 до 30°C, и по меньшей мере одна кислота добавляется к гидролизату биомассы при температуре гидролизата биомассы, выбираемой в диапазоне от 50 до 95°C, предпочтительно от 65 до 85°C. При этом особенно предпочтительно, чтобы разница температур между по меньшей мере одной кислотой и гидролизатом биомассы выбиралась в диапазоне от 35 до 95%, предпочтительно от 40 до 90%.

Также объемом настоящего изобретения предусматривается, чтобы этап с) способа данного изобретения выполнялся перед этапом b).

Композиция, полученная после добавления к гидролизату биомассы по меньшей мере одной кислоты и после регулирования температуры гидролизата биомассы, в объеме настоящей заявки упоминается "как смесь кислоты и гидролизата биомассы".

Согласно этапу (d) способа данного изобретения твердое вещество и жидкая фаза отделяются от смеси кислоты и гидролизата биомассы. Разделение твердой и жидкой фаз кислотно-гидролизатной смеси (в последующем понятие "жидкая фаза" или "жидкая фаза гидролизата" применяется синонимично по отношению к "жидкой фазе кислотно-гидролизатной смеси") может осуществляться любыми средствами, известными специалистам в данной области в качестве подходящих для целей данного изобретения, и предпочтительно выполняется фильтрацией, центрифугированием, декантацией или отжатием, например, с помощью червячного пресса. Предпочтительным является фильтр-пресс, наиболее предпочтительно мембранный фильтр-пресс. В одном предпочтительном воплощении фильтрующая ткань фильтр-пресса имеет проницаемость ткани по воздуху от 2 до 10 л/дм²/мин. В процессе фильтрации могут также добавляться вспомогательные фильтрующие материалы, такие как диатомовая земля или кизельгур, либо перлит, предпочтительно в концентрациях от 0,1 до 10 мас.%, более предпочтительно между 0,5 и 5 мас.% и наиболее предпочтительно между 1 и 3 мас.%.

После разделения твердой и жидкой фаз выполняется деионизация жидкой фазы согласно этапу (e). Деионизация предпочтительно осуществляется с помощью электродиализа, емкостной деионизации, мембранной емкостной деионизации, нанофильтрации, обратным осмосом, хроматографическим разделением, таким как ионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием и/или эксклюзионная хроматография или же любой комбинацией двух или более из этих способов.

"Мембранная емкостная деионизация" выполняется посредством введения в установку для емкостной деионизации катионообменной мембраны и анионообменной мембраны.

В особенно предпочтительных воплощениях деионизация проводится либо с помощью стандартного электродиализа, либо электродиализом с использованием по меньшей мере одной биполярной мембраны, и в особенно предпочтительном случае сопровождается емкостной деионизацией, мембранной емкостной деионизацией или ионообменной хроматографией.

При использовании стандартного электродиализа или электродиализа, применяющего по меньшей мере одну биполярную мембрану для деионизации, удаляемые из раствора ионы предпочтительно извлекаются в жидкость, называемую "концентратом". В этой связи особенно предпочтительным является добавление жидкости в камеру установки электродиализа перед началом деионизации. В следующем предпочтительном воплощении эта жидкость после прекращения деионизации данного объема не заменяется, а концентрат многократно применяется при повторных циклах деионизации на протяжении по меньшей мере 2 циклов, более предпочтительно по меньшей мере 4 циклов, особенно предпочтительные 6 циклов и наиболее предпочтительно 10 циклов.

В настоящем изобретении "электродиализ, применяющий по меньшей мере одну биполярную мембрану" должен пониматься как любая методика, включающая применение трех различных типов мембран, подходящих для удаления солей посредством извлечения ионов, таких как, например, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, SO₄²⁺, PO₃³⁻, Cl⁻, и расщепления H₂O, присутствующей в жидкой фазе. Электродиализ, использующий по меньшей мере одну биполярную мембрану, предпочтительно включает применение катионообменной мембраны, анионообменной мембраны и каталитического промежуточного слоя - так называемой "биполярной мембраны", позволяющей выполнять расщепление воды внутри жидкой фазы на протоны и гидроксидные ионы. За счет комбинации селективного удаления солей катионо- и анионообменными мембранами с одновременной диссоциацией воды на каталитическом промежуточном слое образуются кислотная фракция и фракция основания.

В одном предпочтительном воплощении применяются по меньшей мере одна катионообменная мембрана, по меньшей мере одна анионообменная мембрана и по меньшей мере один каталитический промежуточный слой - или биполярная мембрана. В следующем предпочтительном воплощении последовательно устанавливаются по меньшей мере два комплекта таких мембран, предпочтительно по меньшей мере 4 комплекта, более предпочтительно по меньшей мере 6 комплектов и наиболее предпочтительно по меньшей мере 10 комплектов. В одном особенно предпочтительном воплощении все три мембраны или все комплекты мембран, определенных выше, устанавливаются внутри единственного устройства.

Деионизация предпочтительно выполняется при температуре в диапазоне от 5 до 80°C, более пред-

почтительно в пределах диапазона от 10 до 75°C, наиболее предпочтительно в диапазоне от 15 до 70°C. Падение давления через ячейку электродиализа предпочтительно составляет ниже 1 бар, более предпочтительно ниже 0,5 бар. В следующем особенно предпочтительном воплощении деионизация выполняется до тех пор, пока удельная электропроводность раствора не снижается по меньшей мере до 10 мС/см, более предпочтительно до по меньшей мере 6 мС/см особенно предпочтительно до по меньшей мере 4 мС/см и наиболее предпочтительно до по меньшей мере 2 мС/см.

В следующем предпочтительном воплощении деионизация электродиализом с применением по меньшей мере одной биполярной мембраны сопровождается емкостной деионизацией. Емкостная деионизация предпочтительно применяет так называемую "мембранную емкостную деионизацию", т.е. вводящую в установку для емкостной деионизации катионообменную мембрану и анионообменную мембрану. Если электродиализ, использующий по меньшей мере одну биполярную мембрану, сопровождается мембранной емкостной деионизацией, такой электродиализ перед переключением на мембранную емкостную деионизацию предпочтительно выполняется до тех пор, пока удельная электропроводность раствора не снижается до по меньшей мере 10 мС/см, более предпочтительно до по меньшей мере 6 мС/см, особенно предпочтительно до по меньшей мере 4 мС/см и наиболее предпочтительно до по меньшей мере 2 мС/см. Затем применяется мембранная емкостная деионизация для того, чтобы дополнительно уменьшить удельную электропроводность раствора предпочтительно по меньшей мере до 8 мС/см, более предпочтительно до по меньшей мере 6 мС/см, особенно предпочтительно до по меньшей мере 4 мС/см и наиболее предпочтительно до по меньшей мере 2 мС/см.

В следующем предпочтительном воплощении деионизация электродиализом с применением по меньшей мере одной биполярной мембраны сопровождается ионообменной хроматографией. Если электродиализ, использующий по меньшей мере одну биполярную мембрану, сопровождается ионообменной хроматографией, такой электродиализ перед переключением на мембранную емкостную деионизацию предпочтительно выполняется до тех пор, пока удельная электропроводность раствора не снижается до по меньшей мере 10 мС/см, более предпочтительно до по меньшей мере 6 мС/см, особенно предпочтительно до по меньшей мере 4 мС/см и наиболее предпочтительно до по меньшей мере 2 мС/см. Затем применяется ионообменная хроматография для того, чтобы дополнительно уменьшить удельную электропроводность раствора предпочтительно по меньшей мере до 8 мС/см, более предпочтительно до по меньшей мере 6 мС/см, особенно предпочтительно до по меньшей мере 4 мС/см и наиболее предпочтительно до по меньшей мере 2 мС/см.

В настоящем изобретении "ионный обмен" определяется как обмен ионами между раствором, содержащим по меньшей мере один ион, и твердым полимерным или минеральным ионообменным материалом, при котором диссоциированный в растворе ион обменивается и замещается в результате контакта с ионообменным материалом того же самого заряда.

Деионизация электродиализом, использующим по меньшей мере одну биполярную мембрану, снижает количество отходов, образующихся в ходе деионизации, а также производственные издержки в других применениях. Применение электродиализа, использующего по меньшей мере одну биполярную мембрану, ведет к выработке щелочной фракции, которая может использоваться, например, в качестве модифицирующего рН агента в производстве ферментов, при гидролизе биомассы или для предварительной обработки биомассы. В одном предпочтительном воплощении получаемая щелочная фракция имеет рН от 9 до 14, более предпочтительно от 12 до 13. Применение электродиализа, использующего по меньшей мере одну биполярную мембрану, также приводит к получению кислотной фракции, которая может применяться, например, для гидролиза биомассы, или для предварительной обработки биомассы, или для осуществления этапа с) способа данного изобретения. В одном предпочтительном воплощении получаемая кислотная фракция имеет рН от 1 до 5, более предпочтительно от 2 до 4. Особенно предпочтительным является применение кислотной фракции для обработки паровым взрывом. Наиболее предпочтительно добавление кислотной фракции к гидролизату биомассы согласно этапу с) способа данного изобретения. Деионизация электродиализом предпочтительно выполняется в жидкой фазе при температуре в диапазоне от 5 до 80°C, более предпочтительно в пределах от 10 до 75°C, наиболее предпочтительно от 15 до 70°C. Падение давления через ячейку электродиализа предпочтительно составляет менее 1 бар, более предпочтительно менее 0,5 бар. В следующем особенно предпочтительном воплощении деионизация осуществляется либо стандартным электродиализом, либо электродиализом, использующим по меньшей мере одну биполярную мембрану, до тех пор пока удельная электропроводность раствора не снижается до 10 мС/см, более предпочтительно до 6 мС/см, особенно предпочтительно до 4 мС/см и наиболее предпочтительно до 2 мС/см. В следующем предпочтительном воплощении деионизация затем дополнительно продолжается с помощью емкостной деионизации, мембранной емкостной деионизации или ионообменной хроматографии.

В одном предпочтительном воплощении ионообменные смолы, используемые на этапе ионообменной хроматографии, представлены одной катионообменной смолой и одной анионообменной смолой. В следующем предпочтительном воплощении анионообменная смола и катионообменная смола применяются на последующих этапах ионного обмена. Особенно предпочтительными анионообменными смола-

ми являются анионообменные смолы с функциональными группами третичных аминов. Матрица анионообменной смолы предпочтительно представлена стирол-дивинилбензольным сополимером или сшитой акриловой гелеподобной структурой. Еще более предпочтительны анионообменные смолы в OH^- -форме. Особенно предпочтительными катионообменными смолами являются катионообменные смолы с сульфонатными или функциональными группами карбоновой кислоты. Матрица катионообменной смолы предпочтительно представлена стирол-дивинилбензольным сополимером или сшитой акриловой гелеподобной структурой. Еще более предпочтительны анионообменные смолы в H^+ -форме. В одном предпочтительном воплощении ионообменная смола имеет емкость по меньшей мере 0,5 экв/л смолы, более предпочтительно по меньшей мере 1 экв/л смолы, наиболее предпочтительно по меньшей мере 2 экв/л смолы. 1 Экв определяется как 1 моль иона, обмениваемого данной смолой, деленный на валентность этого иона.

При введении катионообменной смолы в контакт с жидкостью такая жидкость должна иметь температуру от 5 до 135°C, предпочтительно между 10 и 70°C. При введении анионообменной смолы в контакт с жидкостью такая жидкость должна иметь температуру от 5 до 75°C, предпочтительно между 10 и 60°C.

В одном предпочтительном воплощении контактное время при каждом взаимодействии между ионообменной смолой и жидкостью должно находиться между 0,1 и 300 мин, более предпочтительно между 0,2 и 100 мин, наиболее предпочтительно между 0,3 и 10 мин.

Катионообменная смола регенерируется с помощью кислоты, предпочтительно серной кислоты, азотной кислоты, фосфорной кислоты или соляной кислоты. Используемая кислота должна быть концентрированной, предпочтительно имея концентрацию между 0,05 и 20М, наиболее предпочтительно между 0,5 и 10М. Регенерация катионообменной смолы предпочтительно проводится при температуре по меньшей мере 15°C. Анионообменная смола регенерируется с использованием оснований, предпочтительно гидроксида натрия, карбоната натрия или карбоната аммония. Применяемое основание должно быть концентрированным, предпочтительно имея концентрацию между 0,05 и 20М, наиболее предпочтительно между 0,5 и 10М. Регенерация анионообменной смолы предпочтительно проводится при температуре по меньшей мере 15°C. Контактное время ионообменной смолы и основания или кислоты предпочтительно должно составлять по меньшей мере 5 мин, более предпочтительно по меньшей мере 15 мин. Катионо- и анионообменные смолы предпочтительно используются на протяжении по меньшей мере 500 циклов деионизации-регенерации, более предпочтительно по меньшей мере 1500 циклов.

В одном предпочтительном воплощении ионообменная хроматография выполняется в неподвижном слое или в свободном слое внутри хроматографической колонки. Однако ионный обмен согласно настоящему изобретению не будет выполняться на установке псевдодвижущегося слоя. Установки псевдодвижущегося слоя используются только при необходимости отделения друг от друга соединений с очень близкими свойствами, как, например, два сахарных мономера в случае разделения, например, глюкозы и ксилозы. Однако при способе настоящего изобретения из жидкости удаляются соли, т.е. ионы (заряженные частицы) отделяются от остальных компонентов (незаряженных частиц). Поскольку эти два класса предназначаемых для отделения друг от друга компонентов значительно различаются по своим основным физическим свойствам, установка псевдодвижущегося слоя не является подходящей для способа настоящего изобретения. Кроме того, поскольку установка псевдодвижущегося слоя является установкой довольно сложной и дорогой, предпочтительное воплощение, использующее неподвижный слой или свободный слой внутри хроматографической колонки, обеспечивает дополнительные преимущества.

В следующем предпочтительном воплощении анионообменная смола и катионообменная смола находятся в двух различных колонках и не смешиваются. В следующем предпочтительном воплощении предназначенная для деионизации жидкость сначала приводится в контакт с катионообменной смолой, а затем с анионообменной смолой. Следующее предпочтительное воплощение состоит в приведении жидкости в контакт с катионообменной смолой, затем с анионообменной смолой и далее опять со свежей катионообменной смолой или с катионообменной смолой, которая уже использовалась на первом этапе. Следующее предпочтительное воплощение состоит из повторяющихся циклов обработки катионообменной смолой и анионообменной смолой. Ионообменная смола, используемая при повторных циклах, может быть как свежей ионообменной смолой, так и ионообменной смолой, которая уже применялась в предыдущем цикле. Количество повторных циклов контакта между ионообменной смолой и жидкостью предпочтительно находится между 1 и 10, наиболее предпочтительно между 2 и 5.

В ходе приведения жидкости в контакт с ионообменной смолой в колонке скорость потока должна предпочтительно составлять между 1 и 200 объемами слоя в час, более предпочтительно между 2 и 80 объемами слоя в час.

В следующем предпочтительном воплощении ионообменная хроматография выполняется в смешительной емкости.

В следующем особенно предпочтительном воплощении по меньшей мере одно адсорбирующее вещество добавляется перед или в ходе выполнения любого из этапов (b), (c) или (d). По меньшей мере одно адсорбирующее вещество предпочтительно выбирается из группы, состоящей из бентонита, дре-

весного угля, активированного угля, диатомовой земли или кизельгура, перлита, отбеливающей земли, глинистых минеральных веществ, полимерных смол и любых их смесей.

Выполнение этапов с а) по е) способа данного изобретения приводит к композиции, которая в объеме настоящей заявки именуется "очищенным гидролизатом".

Другой объект настоящего изобретения относится к очищенному гидролизату, приготовленному согласно приведенному здесь способу изобретения. Концентрация солей в очищенном гидролизате предпочтительно не превышает 80%, предпочтительно составляет не более 60%, более предпочтительно не более 40%, более предпочтительно не более 20% и наиболее предпочтительно не более 10% относительно концентрации солей, присутствующих после гидролиза субстрата.

Настоящее изобретение, кроме того, касается применения очищенного гидролизата, приготовленного согласно способу данного изобретения, в качестве среды для ферментации.

Ценные органические соединения, образующиеся в результате бактериального брожения очищенного гидролизата, содержат, но не ограничиваются органическими кислотами (такими как уксусная кислота, молочная кислота, янтарная кислота, итаконовая кислота, фумаровая кислота, пропионовая кислота и глюкуроновая кислота), аминокислотами (такими как глутаминовая кислота, лейцин, лизин, треонин, аспарагиновая кислота, фенилаланин, цистеин), капролактамами (такими как α -аминокапролактан), антибиотиками (такими как блеомицин, вирджиниамицин, линкомицин, монензин, бластицидин, тетрациклин), витаминами (такими как витамин B2, B12 и C), ферментами, нуклеотидами/нуклеозидами (такими как NADH, АТР, сАМР, FAD, кофермент А), биогазом, биополимерами (такими как полигидроксibuтират, полиамиды/фиброины), белками, полисахаридами (такими как ксантан, декстран), аминоклюканами (такой как гиалуриновая кислота), а также органическими растворителями и биотопливом (такими как ацетон, этанол, бутанол, пропандиол). Ценные органические соединения, образующиеся в результате дрожжевого брожения очищенного гидролизата, содержат, но не ограничиваются органическими растворителями (например, этанолом, пропанолом), нуклеотидами (например, РНК), биологическими поверхностно-активными веществами (например, софоролипидами), ферментами и биополимерами (например, спидроинами).

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

В следующем предпочтительном воплощении этого способа органическое соединение выбирается из спиртов, органических кислот, биополимеров, антибиотиков, аминокислот, капролактамов, полисахаридов, органических растворителей, биотоплива, аминоклюканов, нуклеотидов/нуклеозидов, витаминов, биологических поверхностно-активных веществ, ферментов и их смесей.

Далее описываются особенно предпочтительные воплощения способа данного изобретения, которые ни в каком отношении не должны восприниматься как ограничивающие данное изобретение.

Особенно предпочтительное воплощение 1.

Особенно предпочтительным является способ очистки гидролизата биомассы, содержащий этапы:

- а) обеспечения гидролизата биомассы;
- б) регулирования температуры гидролизата биомассы до температуры, выбираемой в диапазоне от 50 до 95°C, предпочтительно от 30 до 90°C, особенно предпочтительно от 45 до 75°C и наиболее предпочтительно до 70°C;
- в) добавления к гидролизату биомассы по меньшей мере одной кислоты;
- г) твердо-жидкостного разделения смеси гидролизата биомассы и кислоты с получением твердой фазы и жидкой фазы;
- д) деионизации жидкой фазы кислотного-гидролизатной смеси после разделения согласно этапу г), где биомасса является лигноцеллюлозным субстратом, предпочтительно зерновой соломой или сухими измельченными волокнами сахарного тростника, особенно предпочтительны предварительно обработанные зерновая солома или сухие измельченные волокна.

Особенно предпочтительное воплощение 2.

Способ, определенный здесь в качестве применимого в особенно предпочтительном воплощении 1, при котором этап б) выполняется в течение времени от 1 до 90 мин, предпочтительно в течение 2-75 мин.

Особенно предпочтительное воплощение 3.

Способ, определенный здесь в качестве применимого в особенно предпочтительных воплощениях 1 или 2, при котором кислота является органической кислотой, предпочтительно серной кислотой, и рН гидролизата регулируется до показателя от 2,0 до 3,0.

Особенно предпочтительное воплощение 4.

Способ, определенный здесь в качестве применимого для любого из особенно предпочтительных воплощений 1-3, при котором этап в) выполняется после этапа б).

Особенно предпочтительное воплощение 5.

Способ, определенный здесь в качестве применимого для любого из особенно предпочтительных

воплощений 1-4, при котором твердо-жидкостное разделение осуществляется с помощью фильтр-пресса, предпочтительно мембранного фильтр-пресса.

Особенно предпочтительное воплощение 6.

Способ, определенный здесь в качестве применимого для любого из особенно предпочтительных воплощений 1-5, при котором деионизация осуществляется с помощью электродиализа.

Особенно предпочтительное воплощение 7.

Способ, определенный здесь в качестве применимого для любого из особенно предпочтительных воплощений 1-6, при котором деионизация выполняется с помощью электродиализа, сопровождаемого этапом ионообменной хроматографии или мембранной емкостной деионизации.

Особенно предпочтительное воплощение 8.

Способ, определенный здесь в качестве применимого для любого из особенно предпочтительных воплощений 1-7, при котором деионизация выполняется с помощью электродиализа, применяющего по меньшей мере одну биполярную мембрану.

Особенно предпочтительное воплощение 9.

Способ, определенный здесь в качестве применимого для любого из особенно предпочтительных воплощений 1-6 или 8, при котором деионизация выполняется с помощью электродиализа, применяющего по меньшей мере одну биполярную мембрану и сопровождаемого этапом ионообменной хроматографии или мембранной емкостной деионизации.

Особенно предпочтительное воплощение 10.

Способ, определенный здесь в качестве применимого для любого из особенно предпочтительных воплощений 5-9, при котором деионизация электродиализом предпочтительно выполняется при температуре в диапазоне от 5 до 80°C, более предпочтительно в пределах от 10 до 75°C, наиболее предпочтительно от 15 до 70°C.

Особенно предпочтительное воплощение 11.

Способ, определенный здесь в качестве применимого для любого из особенно предпочтительных воплощений 5-10, при котором деионизация выполняется с помощью электродиализа, и падение давления через ячейку электродиализа предпочтительно составляет менее 1 бар, более предпочтительно менее 0,5 бар.

Особенно предпочтительное воплощение 12.

Способ, определенный здесь в качестве применимого для любого из особенно предпочтительных воплощений 1-4, при котором деионизация осуществляется с помощью ионообменной хроматографии, предпочтительно выполняемой с катионным обменом перед анионным обменом.

Особенно предпочтительное воплощение 13.

Особенно предпочтительным является способ очистки гидролизата биомассы, содержащий этапы:

а) обеспечения гидролизата биомассы из предварительно обработанной зерновой соломы или сухих измельченных волокон;

б) регулирования температуры гидролизата биомассы до температуры, выбираемой в диапазоне от 30 до 90°C и поддерживаемой в течение времени от 2 до 75 мин;

в) добавления к гидролизату биомассы по меньшей мере одной органической кислоты для регулирования pH до показателя от 2,0 до 3,0;

г) выполняемого с помощью мембранного фильтр-пресса твердо-жидкостного разделения смеси гидролизата биомассы и кислоты для получения твердой фазы и жидкой фазы;

е) деионизации жидкой фазы кислотно-гидролизатной смеси после осуществления разделения согласно этапу г), при том что деионизация выполняется с помощью электродиализа, сопровождаемого этапом ионообменной хроматографии или мембранной емкостной деионизации.

Особенно предпочтительное воплощение 14.

Особенно предпочтительным является способ очистки гидролизата биомассы, содержащий этапы:

а) обеспечения гидролизата биомассы из предварительно обработанной зерновой соломы или сухих измельченных волокон;

б) регулирования температуры гидролизата биомассы до температуры, выбираемой в диапазоне от 30 до 90°C и поддерживаемой в течение времени от 2 до 75 мин;

в) добавления к гидролизату биомассы по меньшей мере одной органической кислоты для регулирования pH до показателя от 2,0 до 3,0;

г) выполняемого с помощью мембранного фильтр-пресса твердо-жидкостного разделения смеси гидролизата биомассы и кислоты для получения твердой фазы и жидкой фазы;

е) деионизации жидкой фазы кислотно-гидролизатной смеси после разделения согласно этапу г), при том что деионизация осуществляется с помощью ионообменной хроматографии, выполняемой с катионным обменом перед анионным обменом.

Особенно предпочтительное воплощение 15.

Особенно предпочтительным является способ очистки гидролизата биомассы, содержащий этапы:

а) обеспечения гидролизата биомассы из предварительно обработанной зерновой соломы или сухих

измельченных волокон;

b) регулирования температуры гидролизата биомассы до температуры, выбираемой в диапазоне от 30 до 90°C и поддерживаемой в течение времени от 2 до 75 мин;

c) добавления к гидролизату биомассы по меньшей мере одной органической кислоты для регулирования pH до показателя от 2,0 до 3,0;

d) выполняемого с помощью мембранного фильтр-пресса твердо-жидкостного разделения смеси гидролизата биомассы и кислоты для получения твердой фазы и жидкой фазы;

e) деионизации жидкой фазы кислотно-гидролизатной смеси после разделения согласно этапу d), при том, что деионизация осуществляется с помощью ионообменной хроматографии, выполняемой с катионным обменом перед анионным обменом.

Особенно предпочтительное воплощение 16.

Особенно предпочтительным является способ очистки гидролизата биомассы, содержащий этапы:

a) обеспечения гидролизата биомассы из предварительно обработанной зерновой соломы или сухих измельченных волокон;

b) регулирования температуры гидролизата биомассы до температуры, выбираемой в диапазоне от 30 до 90°C и поддерживаемой в течение времени от 2 до 75 мин;

c) добавления к гидролизату биомассы по меньшей мере одной органической кислоты для регулирования pH до показателя от 2,0 до 3,0;

d) выполняемого с помощью мембранного фильтр-пресса твердо-жидкостного разделения смеси гидролизата биомассы и кислоты для получения твердой фазы и жидкой фазы;

e) деионизации жидкой фазы кислотно-гидролизатной смеси после разделения согласно этапу d), при том что деионизация осуществляется с помощью ионообменной хроматографии, выполняемой с катионным обменом перед анионным обменом, и

и при том что добавление осуществляется перед регулированием температуры согласно этапу b).

Особенно предпочтительное воплощение 17.

Особенно предпочтительным является способ очистки гидролизата биомассы, содержащий этапы:

a) обеспечения гидролизата биомассы из предварительно обработанной зерновой соломы или сухих измельченных волокон;

b) регулирования температуры гидролизата биомассы до температуры, выбираемой в диапазоне от 30 до 90°C и поддерживаемой в течение времени от 2 до 75 мин;

c) добавления к гидролизату биомассы по меньшей мере одной органической кислоты для регулирования pH до показателя от 2,0 до 3,0;

d) выполняемого с помощью мембранного фильтр-пресса твердо-жидкостного разделения смеси гидролизата биомассы и кислоты для получения твердой фазы и жидкой фазы;

e) деионизации жидкой фазы кислотно-гидролизатной смеси после разделения согласно этапу d), при том что деионизация осуществляется с помощью ионообменной хроматографии, выполняемой с катионным обменом перед анионным обменом, и

и при том что добавление осуществляется после регулирования показателя pH согласно этапу b).

Примеры и чертежи

Далее изобретение поясняется с помощью следующего неограничивающего примера и чертежей. Как пример, так и чертежи приводятся исключительно в иллюстративных целях и не должны восприниматься в качестве ограничивающих данное изобретение.

Фиг. 1 демонстрирует относительное возрастание степени извлечения соли после ионообменной хроматографии необработанного гидролизата (левый столбец) и после ионообменной хроматографии гидролизата, подвергнутого обработке, отвечающей способу настоящего изобретения, согласно примеру 1 (способ данного изобретения: нагревание до 70°C, сопровождаемое сдвигом показателя pH до 2,5) (правый столбец);

фиг. 2 отображает относительное возрастание массы анионообменной смолы после ионообменной хроматографии необработанного гидролизата (левый столбец) и после ионообменной хроматографии гидролизата, подвергнутого обработке при осуществлении способа настоящего изобретения, согласно примеру 1 (способ данного изобретения: нагревание до 70°C, сопровождаемое сдвигом показателя pH до 2,5) (правый столбец);

фиг. 3 демонстрирует относительное возрастание степени извлечения соли после ионообменной хроматографии необработанного гидролизата (левый столбец) и после ионообменной хроматографии гидролизата, подвергнутого обработке при осуществлении способа настоящего изобретения, согласно примеру 2 (способ данного изобретения: добавление бентонита, нагревание до 70°C, сопровождаемое сдвигом показателя pH до 2,5) (правый столбец);

фиг. 4 отображает относительное возрастание массы анионообменной смолы после ионообменной хроматографии необработанного гидролизата (левый столбец) и после ионообменной хроматографии гидролизата, подвергнутого обработке при осуществлении способа настоящего изобретения согласно примеру 2 (способ данного изобретения: добавление бентонита, нагревание до 70°C, сопровождаемое

сдвигом показателя рН до 2,5) (правый столбец);

фиг. 5 демонстрирует относительное возрастание степени извлечения соли после ионообменной хроматографии необработанного гидролизата (левый столбец) и после ионообменной хроматографии гидролизата, подвергнутого обработке при осуществлении способа настоящего изобретения, согласно примеру 3 (способ данного изобретения: нагревание до 70°C, сопровождаемое сдвигом показателя рН до 2,5 и добавлением кизельгура) (правый столбец);

фиг. 6 отображает относительное возрастание массы анионообменной смолы после ионообменной хроматографии необработанного гидролизата (левый столбец) и после ионообменной хроматографии гидролизата, подвергнутого обработке при осуществлении способа настоящего изобретения согласно примеру 3 (способ данного изобретения: нагревание до 70°C, сопровождаемое сдвигом показателя рН до 2,5 и добавлением кизельгура) (правый столбец);

фиг. 7 показывает относительное количество ксилозы, израсходованное после 16 ч ферментации *Rachysolen tannophilus* при использовании гидролизата, прошедшего обработку согласно настоящему изобретению, как описано в примере 4;

фиг. 8 отображает выход ферментации в том, что касается выраженных в граммах количеств итаконной кислоты, произведенной за 100 ч ферментации *Aspergillus terreus*, на 1 г сахара при использовании гидролизата, обработанного согласно настоящему изобретению, как описано в примере 5;

фиг. 9 отображает выход ферментации в том, что касается выраженных в граммах количеств итаконной кислоты, произведенной за 100 ч ферментации *Aspergillus terreus*, на 1 г сахара при использовании гидролизата, обработанного согласно настоящему изобретению, как описано в примере 6.

Пример 1.

Зерновая солома с содержанием сухого вещества 45 мас.% была предварительно обработана паровым взрывом (220°C). После проведения такой предварительной обработки паровым взрывом зерновая солома ("субстрат") помещалась в смесительную емкость (Labfors, Infors AG, Швейцария). Ферментная композиция, содержащая 91,3 мас.% Celluclast® (целлюлаза *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) и 8,7 мас.% глюкозидазы (49291 Sigma), была добавлена к субстрату в количестве, обеспечивающем отношение фермента к твердому материалу, отвечающее 0,5 мас.%, с тем, чтобы гидролизовать субстрат и получить суспензию. Гидролиз проводился при 50°C, рН 5,0 в течение 72 ч при перемешивании на скорости 50 об/мин. После прохождения гидролиза суспензия нагревалась в течение 1 ч при 70°C с перемешиванием на скорости 200 об/мин, а затем с помощью 1М H₂SO₄ устанавливался показатель рН 2,5. Обработанная таким образом суспензия затем отфильтровывалась с помощью фильтр-пресса с фильтрующей тканью, имевшей показатель проницаемости по воздуху 5 л/дм²/мин, при постоянном давлении 3 бар с тем, чтобы получить жидкость и твердую фазу. 200 мл жидкой фазы затем подвергалось деионизации с применением ионообменной смолы: жидкость закачивалась в стеклянную колонку (XK16, GE Healthcare), содержащую 30 г катионообменной смолы (Lewatit® S8528, Lanxess) при скорости нагнетания 5 мл/мин и комнатной температуре. Полученная после катионообменной колонки жидкая фаза закачивалась в стеклянную колонку (XK16, GE Healthcare), содержащую 30 г анионообменной смолы (Lewatit® S6368 A, Lanxess) при скорости нагнетания 5 мл/мин и комнатной температуре. Аналогичный процесс деионизации был реализован с гидролизатом, который не подвергался обработке с этапом нагревания и сдвига рН до показателя 2,5 (т.е. способ существующего уровня техники). Факт улучшения методики очистки демонстрировался по двум показателям: (1) эффективности деионизации и (2) количеству загрязнений на ионообменной (IEX) смоле.

Была оценена эффективность деионизации в обоих испытаниях измерением количества солей, удаленных из жидкой фазы гидролизата. Результаты представлены на фиг. 1. Сравнение показывает значительное увеличение степени удаления соли в случае жидкой фазы гидролизата, который обрабатывался с выполнением этапов нагревания и сдвига рН, относительно удаления соли из необработанный жидкой фазы гидролизата (способ существующего уровня техники).

Загрязнение анионообменной смолы в обоих испытаниях определялось сравнением увеличения массы анионообменной смолы до и после деионизации. Результаты представлены на фиг. 2. Сравнение этого показателя для обоих испытаний указывает на более сильное засорение в 30,3% на смоле, которая контактировала с необработанным гидролизатом (полученным согласно способу существующего уровня техники).

Пример 2.

Зерновая солома с содержанием сухого вещества 45 мас.% была подвергнута предварительной обработке паровым взрывом (220°C). После проведения такой предварительной обработки паровым взрывом зерновая солома ("субстрат") помещалась в смесительную емкость (Labfors, Infors AG, Швейцария). Ферментная композиция, содержащая 91,3 мас.% Celluclast® (целлюлаза *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) и 8,7 мас.% глюкозидазы (49291 Sigma), была добавлена к субстрату в количестве, обеспечивающем отношение фермента к твердому материалу, отвечающее 0,5 мас.%, с тем, чтобы гидролизовать субстрат и получить суспензию. Гидролиз проводился при 50°C, рН 5,0 в течение 72 ч при перемешивании со скоростью 50 об/мин. После проведения гидролиза к суспензии было добавлено 2 мас.%

бентонита (Tonsil® 210 FF, Clariant Produkte (Deutschland) GmbH) и смесь перемешивалась в течение 1 ч на скорости 200 об/мин при комнатной температуре. Затем суспензия нагревалась в течение 1 ч при 70°C с перемешиванием на скорости 200 об/мин, а затем с помощью 1M H₂SO₄ устанавливался показатель pH 2,5. Обработанная таким образом суспензия затем отфильтровывалась с помощью фильтр-пресса с фильтрующей тканью, имевшей показатель проницаемости по воздуху 5 л/дм²/мин, при постоянном давлении 3 бар с тем, чтобы получить жидкую и твердую фазу. 200 мл жидкой фазы затем подвергалось деионизации с применением ионообменной смолы: жидкость закачивалась в стеклянную колонку (XK16, GE Healthcare), содержащую 30 г катионообменной смолы (Lewatit® S8528, Lanxess) при скорости нагнетания 5 мл/мин и комнатной температуре. Полученная после катионообменной колонки жидкая фаза закачивалась в стеклянную колонку (XK16, GE Healthcare), содержащую 30 г анионообменной смолы (Lewatit® S6368 A, Lanxess) при скорости нагнетания 5 мл/мин и комнатной температуре. Аналогичный процесс деионизации был реализован с гидролизатом, который не обрабатывался бентонитом с этапом нагревания и сдвига pH до показателя 2,5 (т.е. способ существующего уровня техники). Факт улучшения методики очистки демонстрировался по двум показателям: (1) эффективности деионизации и (2) количеству загрязнений на ионообменной (IEX) смоле.

В обоих испытаниях оценивалась эффективность деионизации посредством измерения количества солей, удаленных из жидкой фазы гидролизата. Результаты представлены на фиг. 3. Сравнение показывает значительное увеличение степени удаления соли в случае жидкой фазы гидролизата, который обрабатывался бентонитом с выполнением этапов нагревания и сдвига pH, относительно удаления соли из необработанной жидкой фазы гидролизата (способ существующего уровня техники).

Загрязнение анионообменной смолы в обоих испытаниях определялось сравнением увеличения массы анионообменной смолы до и после деионизации. Результаты представлены на фиг. 4. Сравнение этого показателя для обоих испытаний указывает на более сильное засорение в 26,5% на смоле, которая контактировала с необработанным гидролизатом (полученным согласно способу существующего уровня техники).

Пример 3.

Зерновая солома с содержанием сухого вещества 45 мас.% была подвергнута предварительной обработке паровым взрывом (220°C). После проведения такой предварительной обработки паровым взрывом зерновая солома ("субстрат") помещалась в смесительную емкость (Labfors, Infors AG, Швейцария). Ферментная композиция, содержащая 91,3 мас.% Celluclast® (целлюлаза *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) и 8,7 мас.% глюкозидазы (49291 Sigma), была добавлена к субстрату в количестве, обеспечивающем отношение фермента к твердому материалу, отвечающее 0,5 мас.%, с тем, чтобы гидролизовать субстрат и получить суспензию. Гидролиз проводился при 50°C, pH 5,0 в течение 72 ч при перемешивании со скоростью 50 об/мин. После прохождения гидролиза суспензия нагревалась в течение 1 ч при 70°C с перемешиванием со скоростью в 200 об/мин, а затем с помощью 1M H₂SO₄ устанавливался показатель pH 2,5. Затем к суспензии было добавлено 2 мас.% кизельгура (Vecogur® 200, Eaton), который в течение 1 ч перемешивался на скорости 200 об/мин при комнатной температуре. Обработанная таким образом суспензия затем отфильтровывалась с помощью фильтр-пресса с фильтрующей тканью, имевшей показатель проницаемости по воздуху 5 л/дм²/мин, при постоянном давлении 3 бар с тем, чтобы получить жидкую и твердую фазу. Жидкая фаза подвергалась после этого деионизации с применением ионообменной смолы: жидкость вливалась в стеклянную смесительную емкость (Multifors, Infors AG), куда при комнатной температуре было добавлено 15 мас.% катионообменной смолы (Lewatit® S8528, Lanxess). Смесь перемешивалась в течение 1 ч на 200 об/мин. Далее катионообменная смола была удалена посредством фильтрования смеси через бумажный фильтр (черная лента 589/1, Whatman). Полученная жидкая фаза вновь заливалась в стеклянную смесительную емкость (Multifors, Infors AG) и при комнатной температуре добавлялось 15 мас.% анионообменной смолы (Lewatit® S6368 A, Lanxess). Смесь перемешивалась в течение 1 ч на 200 об/мин. Далее анионообменная смола была удалена посредством фильтрования смеси через бумажный фильтр (черная лента 589/1, Whatman). Аналогичный процесс деионизации был реализован с гидролизатом, который не подвергался обработке на этапах нагревания и сдвига pH до 2,5 с последующим добавлением кизельгура (т.е. способ существующего уровня техники). Факт улучшения методики очистки демонстрировался двумя показателями: (1) эффективностью деионизации и (2) количеством загрязнений на ионообменной (IEX) смоле.

В обоих испытаниях оценивалась эффективность деионизации посредством измерения количества солей, удаленных из жидкой фазы гидролизата. Результаты представлены на фиг. 5. Сравнение показывает значительное увеличение степени удаления соли в случае жидкой фазы гидролизата, который обрабатывался с выполнением этапов нагревания и сдвига pH при последующем добавлении кизельгура, относительно удаления соли из необработанной жидкой фазы гидролизата (способ существующего уровня техники).

Загрязнение анионообменной смолы в обоих испытаниях определялось сравнением увеличения массы анионообменной смолы до и после деионизации. Результаты представлены на фиг. 6. Сравнение этого показателя для обоих испытаний указывает на более сильное засорение в 26,4% на смоле, которая

контактировала с необработанным гидролизатом (полученным согласно способу существующего уровня техники).

Пример 4.

Зерновая солома с содержанием сухого вещества 45 мас.% была подвергнута предварительной обработке паровым взрывом (220°C). После проведения такой предварительной обработки паровым взрывом зерновая солома ("субстрат") помещалась в смесительную емкость (Labfors, Infors AG, Швейцария). Ферментная композиция, содержащая 91,3 мас.% Celluclast® (целлюлаза *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) и 8,7 мас.% глюкозидазы (49291 Sigma), была добавлена к субстрату в количестве, обеспечивающем отношение фермента к твердому материалу, отвечающее 0,5 мас.%, с тем, чтобы гидролизовать субстрат и получить суспензию. Гидролиз проводился при 50°C, pH 5,0 в течение 72 ч при перемешивании со скоростью 50 об/мин. После прохождения гидролиза суспензия нагревалась в течение 1 ч при 70°C с перемешиванием на скорости 200 об/мин, а затем с помощью 1M H₂SO₄ устанавливался показатель pH 2,5. Обработанная таким образом суспензия затем отфильтровывалась с помощью фильтр-пресса с фильтрующей тканью, имевшей показатель проницаемости по воздуху 5 л/дм²/мин, при постоянном давлении 3 бар с тем, чтобы получить жидкость и твердую фазу. Жидкая фаза затем деионизировалась электродиализом с биполярными мембранами (ED64004, PCCell) при использовании мембранного пакета, составленного из 10 биполярных мембран (PCCell), 10 анионообменных мембран (ПК 200D, PCCell) и 9 катионообменных мембран (PC SK, PCCell). Электродиализ проводился при 32°C в течение 2 ч и со скоростями нагнетания 50 л/ч для дилуата и концентрата. Спустя 2 ч электропроводность снизилась на 83%. Взвешивание мембран для электродиализа после деионизации показало, что эти мембраны имели более низкую массу по сравнению с мембранами, использовавшимися в случае необработанного гидролизата (полученного согласно способу существующего уровня техники). Таким образом, была снижена степень образования засорений на мембранах, используемых с обработанным гидролизатом, по сравнению с выполнением электродиализа с гидролизатом, обработке не подвергавшимся (существующий уровень техники).

После прохождения электродиализа обработанный гидролизат применялся в качестве субстрата для ферментации *Pachysolen tannophilus*. Ферментация выполнялась в стеклянной смесительной емкости (Multifors, Infors AG, Швейцария) с устройством контроля температуры и pH. Ферментация запускалась посредством добавления 10 мас.% культуры для посева *Pachysolen tannophilus* (DSMZ Номер № 70352, Брауншвейг) к 750 мл прошедшего обработку гидролизата после электродиализа. Ферментация проводилась в периодическом режиме при 30°C и pH 6,0, в течение 100 ч с перемешиванием на 200 об/мин. Интенсивность потребления ксилитозы при использовании гидролизата согласно способу данного изобретения оказалась значительно увеличена по сравнению с необработанным гидролизатом, приводя, таким образом, к значительному ускорению процесса ферментации, увеличению производительности и снижению затрат. Результаты представлены на фиг. 7.

Пример 5.

Зерновая солома с содержанием сухого вещества 45 мас.% была подвергнута предварительной обработке паровым взрывом (220°C). После проведения такой предварительной обработки паровым взрывом зерновая солома ("субстрат") помещалась в смесительную емкость (Labfors, Infors AG, Швейцария). Ферментная композиция, содержащая 91,3 мас.% Celluclast® (целлюлаза *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) и 8,7 мас.% глюкозидазы (49291 Sigma), была добавлена к субстрату в количестве, обеспечивающем отношение фермента к твердому материалу, отвечающее 0,5 мас.%, с тем, чтобы гидролизовать субстрат и получить суспензию. Гидролиз проводился при 50°C, pH 5,0 в течение 72 ч при перемешивании со скоростью 50 об/мин. После прохождения гидролиза суспензия нагревалась в течение 1 ч при 70°C с перемешиванием со скоростью в 200 об/мин, а затем с помощью 1M H₂SO₄ устанавливался показатель pH 2,5. Обработанная таким образом суспензия затем отфильтровывалась с помощью фильтр-пресса с фильтрующей тканью, имевшей показатель проницаемости по воздуху 5 л/дм²/мин, при постоянном давлении 3 бар с тем, чтобы получить жидкость и твердую фазу. Жидкая фаза затем деионизировалась электродиализом с биполярными мембранами (ED64004, PCCell) при использовании мембранного пакета, составленного из 10 биполярных мембран (PCCell), 10 анионообменных мембран (ПК 200D, PCCell) и 9 катионообменных мембран (PC SK, PCCell). Электродиализ проводился при 32°C в течение 2 ч и со скоростями нагнетания 50 л/ч для дилуата и концентрата. Спустя 2 ч электропроводность снизилась на 83%. Взвешивание мембран для электродиализа после деионизации показало, что эти мембраны имели более низкую массу по сравнению с мембранами, использовавшимися в случае необработанного гидролизата (полученного согласно способу существующего уровня техники). Таким образом, была снижена степень образования засорений на мембранах, используемых с обработанным гидролизатом, по сравнению с выполнением электродиализа гидролизатом, обработке не подвергавшимся (существующий уровень техники). После прохождения электродиализа обработанный гидролизат применялся в качестве субстрата для ферментации *Aspergillus terreus*. Ферментация выполнялась во встряхиваемых колбах на 50 мл, помещенных в термостат (Multitron, Infors AG, Швейцария). Ферментация запускалась посредством добавления 10 мас.% культуры для посева *Aspergillus terreus* (ATCC 32359) к 10 мл прошедшего обра-

ботку гидролизата после электродиализа. Ферментация проводилась в периодическом режиме при 35°C, pH 3,0 и относительной влажности 80%, в течение 100 ч с перемешиванием на 250 об/мин. В то время как ферментация *Aspergillus terreus* в необработанном гидролизате не показала ни значительного роста, ни значительного продуцирования итаконовой кислоты, гидролизат, обработанный согласно изобретению, сделал возможными существенный клеточный рост и значительную выработку итаконовой кислоты. Выход ферментации по итаконовой кислоте в граммах кислоты на грамм сахара отображен на фиг. 8.

Пример 6.

Зерновая солома с содержанием сухого вещества 45 мас.% была подвергнута предварительной обработке паровым взрывом (220°C). После проведения такой предварительной обработки паровым взрывом зерновая солома ("субстрат") помещалась в смесительную емкость (Labfors, Infors AG, Швейцария). Ферментная композиция, содержащая 91,3 мас.% Celluclast® (целлюлаза *Trichoderma reesei* ATCC 26921, C2730 Sigma) и 8,7 мас.% глюкозидазы (49291 Sigma), была добавлена к субстрату в количестве, обеспечивающем отношение фермента к твердому материалу, отвечающее 0,5 мас.%, с тем, чтобы гидролизовать субстрат и получить суспензию. Гидролиз проводился при 50°C, pH 5,0 в течение 72 ч при перемешивании со скоростью 50 об/мин. После прохождения гидролиза суспензия нагревалась в течение 1 ч при 70°C с перемешиванием со скоростью 200 об/мин, а затем с помощью 1M H₂SO₄ устанавливался показатель pH 2,5. Обработанная таким образом суспензия затем отфильтровывалась с помощью фильтра-пресса с фильтрующей тканью, имевшей показатель проницаемости по воздуху 5 л/дм²/мин, при постоянном давлении 3 бар с тем, чтобы получить жидкость и твердую фазу. Жидкая фаза далее деионизировалась электродиализом с биполярными мембранами (ED64004, PCCell) при использовании мембранного пакета, составленного из 10 биполярных мембран (PCCell), 10 анионообменных мембран (ПК 200D, PCCell) и 9 катионообменных мембран (PC SK, PCCell). Электродиализ проводился при 32°C в течение 2 ч и со скоростями нагнетания 50 л/ч для дилуата и концентрата. Спустя 2 ч электропроводность снизилась на 83%. Взвешивание мембран для электродиализа после деионизации показало, что эти мембраны имели более низкую массу по сравнению с мембранами, использовавшимися в случае необработанного гидролизата (полученного согласно способу существующего уровня техники). Таким образом, была снижена степень образования засорений на мембранах, используемых с обработанным гидролизатом, по сравнению с выполнением электродиализа с гидролизатом, обработке не подвергавшимся (существующий уровень техники).

После прохождения электродиализа 200 мл этого обработанного гидролизата было приведено в контакт с 30 г ионообменной смолы (Lewatit® S6368 A, Lanxess) в стеклянной колонке ХК16 при использовании установки Akta Explorer (GE Healthcare). Скорость потока составляла 1 мл/мин, а контактное взаимодействие осуществлялось при 21°C.

После подвергания электродиализу и ионообменной хроматографии обработанный гидролизат применялся в качестве субстрата для ферментации *Aspergillus terreus*. Ферментация выполнялась во встряхиваемых колбах на 50 мл, помещенных в термостат (Multitron, Infors AG, Швейцария). Ферментация запускалась посредством добавления 10 мас.% культуры для посева *Aspergillus terreus* (ATCC 32359) к 10 мл прошедшего обработку гидролизата после электродиализа и ионообменной хроматографии. Ферментация проводилась в периодическом режиме при 35°C, pH 3,0 и относительной влажности 80%, в течение 100 ч с перемешиванием на 250 об/мин. В то время как ферментация *Aspergillus terreus* в необработанном гидролизате не показала ни значительного роста, ни значительного продуцирования итаконовой кислоты, гидролизат, обработанный согласно настоящему изобретению, сделал возможными существенный клеточный рост и существенно улучшенную выработку итаконовой кислоты. Выход ферментации по итаконовой кислоте в граммах кислоты на грамм сахара отображен на фиг. 9.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки гидролизата лигноцеллюлозной биомассы, содержащий этапы:
 - a) обеспечения гидролизата лигноцеллюлозной биомассы, где гидролизат получен путем добавления к биомассе ферментов, относящихся к классу гидролаз;
 - b) регулирования температуры гидролизата лигноцеллюлозной биомассы до температуры, выбираемой в диапазоне от 50 до 95°C;
 - c) добавления к гидролизату лигноцеллюлозной биомассы по меньшей мере одной кислоты;
 - d) твердо-жидкостного разделения смеси гидролизата лигноцеллюлозной биомассы и кислоты с получением твердой фазы и жидкой фазы;
 - e) деионизации жидкой фазы смеси гидролизата лигноцеллюлозной биомассы и кислоты после разделения согласно этапу d).
2. Способ по п.1, в котором температура согласно этапу b) выбирается в диапазоне от 65 до 90°C.
3. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором по меньшей мере одна кислота добавляется до тех пор, пока не достигается показатель pH гидролизата лигноцеллюлозной биомассы от 2,0 до 4,5.
4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором по меньшей мере одна кислота выби-

рается из кислот с величинами рКа от -4,0 до 5,0.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором перед или в течение любого из этапов b) или d) добавляется по меньшей мере одно адсорбирующее вещество.

6. Способ по п.5, в котором по меньшей мере одно адсорбирующее вещество выбирается из группы, состоящей из бентонита, древесного угля, активированного угля, диатомовой земли или кизельгура, перлита, отбеливающей земли, глинистых минеральных веществ, полимерных смол и любых их смесей.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором этапы b) и c) являются, по меньшей мере, частично выполняемыми одновременно.

8. Способ по п.7, в котором по меньшей мере одна кислота добавляется во время регулирования температуры гидролизата до температуры, выбираемой в диапазоне от 65 до 90°C, начиная от температуры 50°C.

9. Способ по любому из пп.1-7, в котором температура по меньшей мере одной кислоты выбирается от 5 до 45°C и по меньшей мере одна кислота добавляется к гидролизату лигноцеллюлозной биомассы при температуре гидролизата, выбираемой в диапазоне от 70 до 95°C.

10. Способ по п.9, в котором различия в температурах между по меньшей мере одной кислотой и гидролизатом лигноцеллюлозной биомассы выбираются в диапазоне от 35 до 95%.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором деионизация осуществляется электродиализом, ионообменной хроматографией, мембранной емкостной деионизацией, нанофильтрацией, обратным осмосом, хроматографическим разделением, гидрофобной хроматографией, эксклюзионной хроматографией или любой их комбинацией.

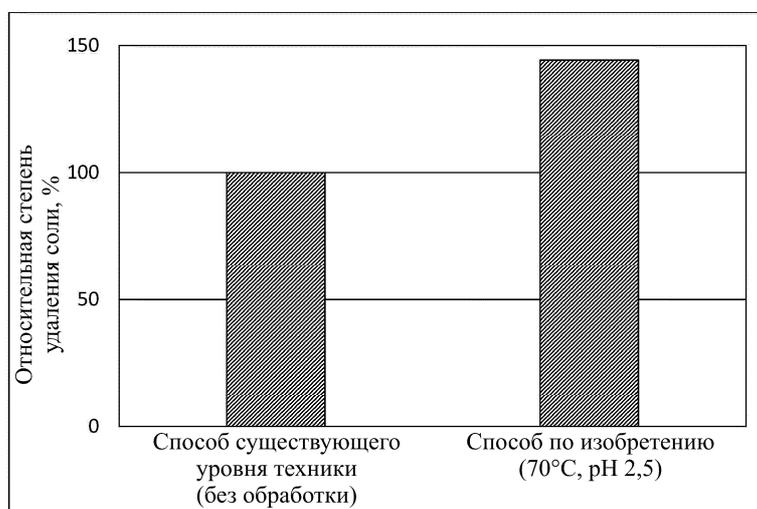
12. Способ по п.11, в котором деионизация выполняется с помощью электродиализа, сопровождаемого мембранной емкостной деионизацией или ионообменной хроматографией.

13. Способ по п.11, в котором деионизация выполняется электродиализом, применяющим по меньшей мере одну биполярную мембрану.

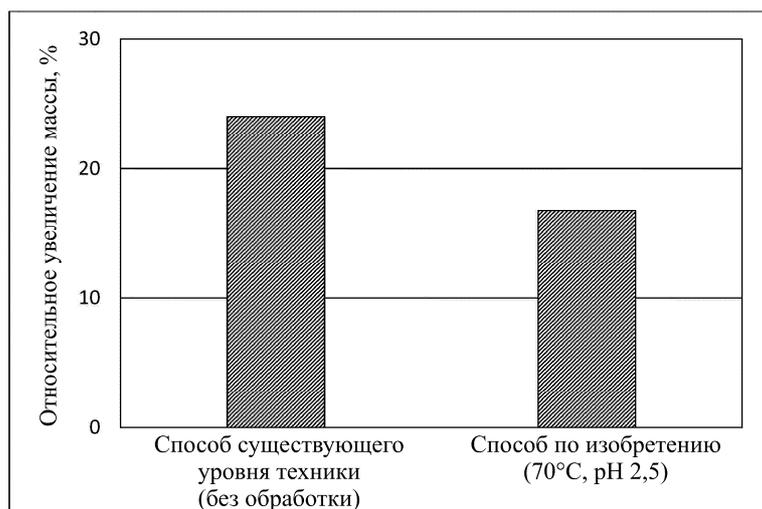
14. Способ по любому из пп.1-6 или 11-13, в котором этап c) выполняется перед этапом b).

15. Очищенный гидролизат лигноцеллюлозной биомассы, приготовленный согласно способу по любому из пп.1-14.

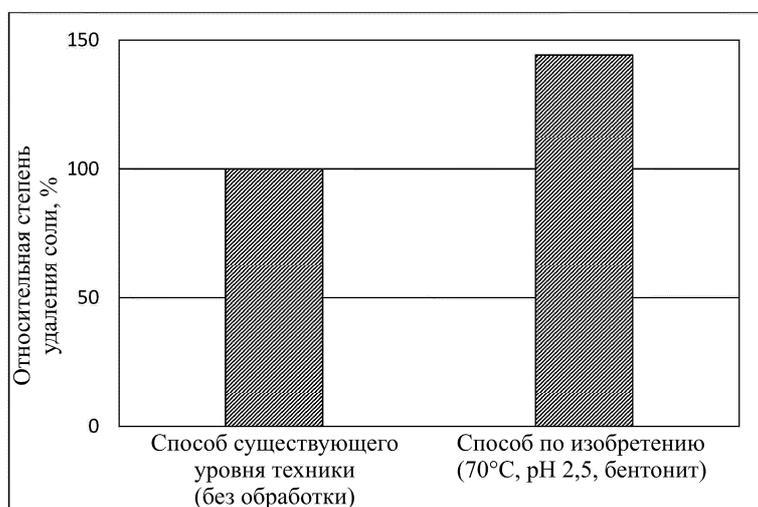
16. Применение очищенного гидролизата лигноцеллюлозной биомассы по п.15 в качестве среды для ферментации.



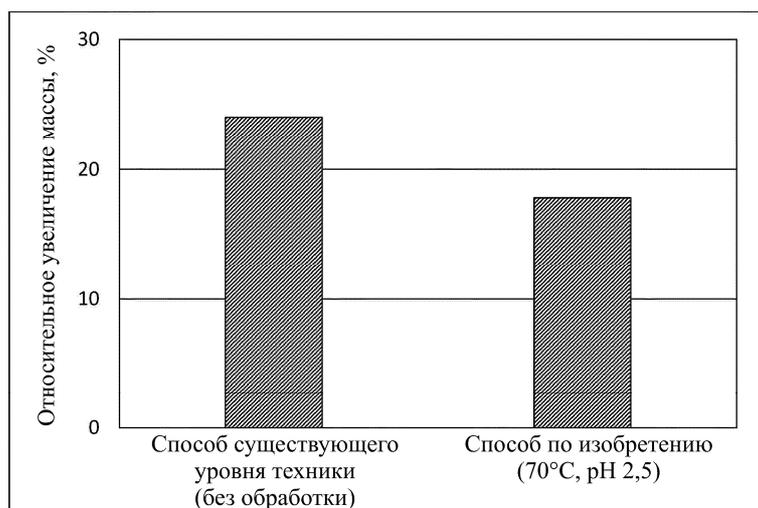
Фиг. 1



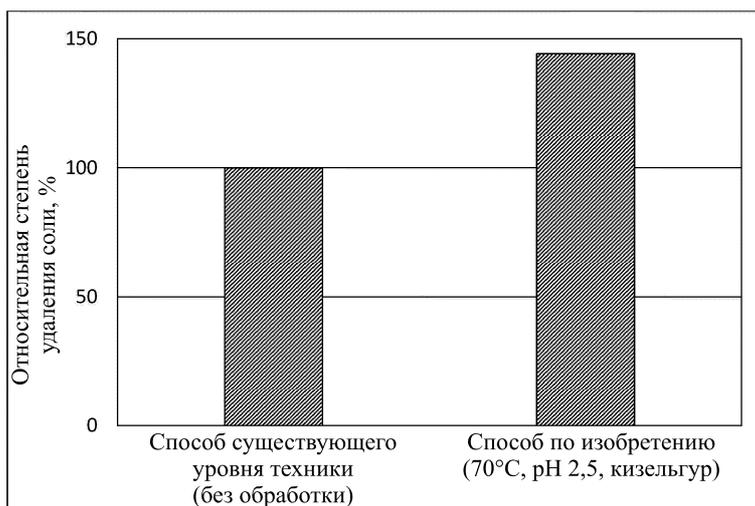
Фиг. 2



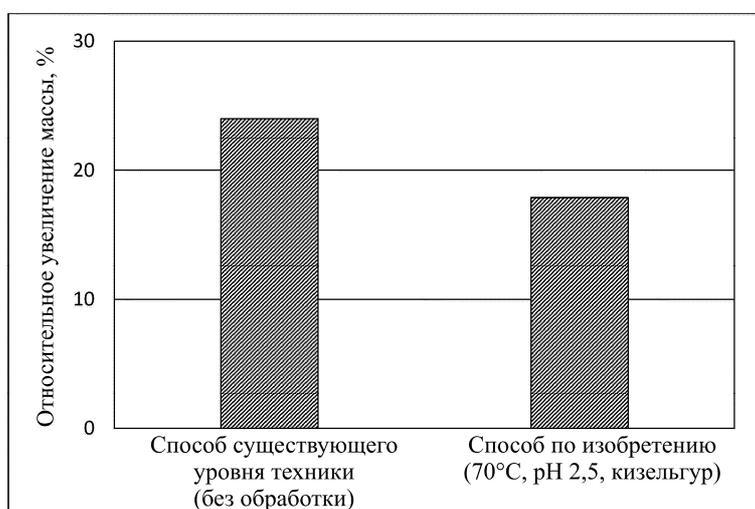
Фиг. 3



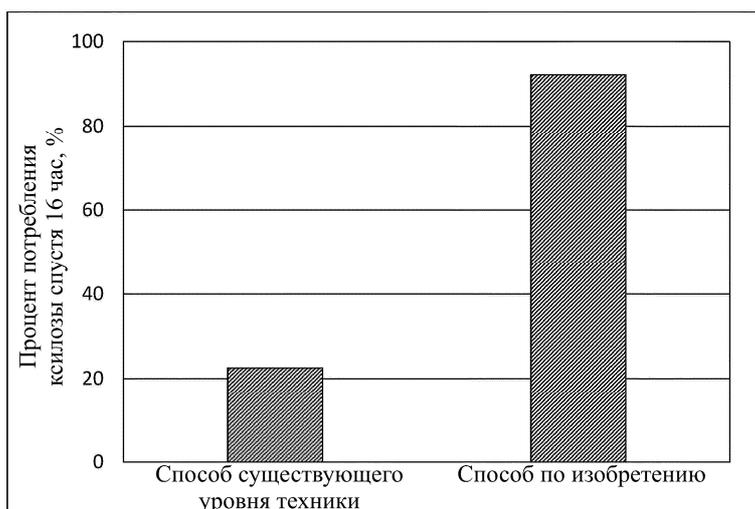
Фиг. 4



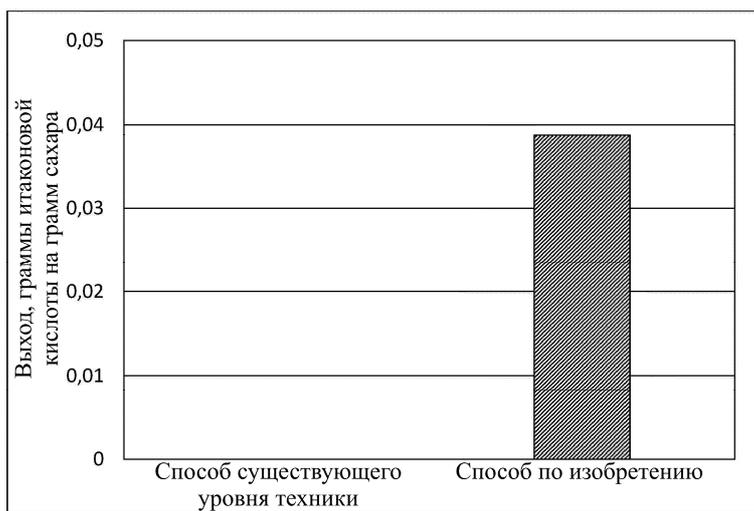
Фиг. 5



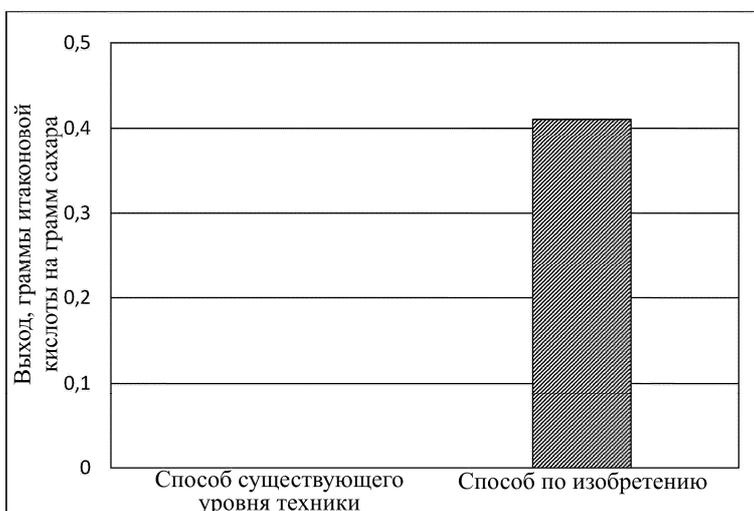
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

