



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104797714 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 22

---

(21) 申请号 201380059313. 8 (51) Int. Cl.  
(22) 申请日 2013. 11. 08 *C12P 19/14(2006. 01)*  
(30) 优先权数据 *C12P 7/14(2006. 01)*  
A50511/2012 2012. 11. 14 AT *C12P 7/18(2006. 01)*  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 *C12P 7/24(2006. 01)*  
2015. 05. 13  
(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2013/073411 2013. 11. 08  
(87) PCT国际申请的公布数据  
W02014/076012 DE 2014. 05. 22  
(71) 申请人 安尼基有限责任公司  
地址 奥地利格拉茨  
(72) 发明人 道泽·亨德里克·沃茨 本德·梅耶  
(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11201  
代理人 宋融冰

权利要求书2页 说明书10页

---

(54) 发明名称

用于获得糖衍生物的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于将来自含半纤维素的材料的糖转化成具有至少一个离子结合位点的化合物的形式的方法以及所述方法的用途,所述方法的特征在于将所述含半纤维素的材料以酶促或非酶促方式水解并且使所获得的水解产物经受包含至少一个酶促步骤的反应,其中糖被释放并且所释放的糖被转化成具有至少一个离子结合位点的化合物。

1. 一种用于将来自含半纤维素的材料、特别是从生物质获得的糖转化成具有至少一个离子结合位点的化合物的形式的方法,其特征在于将所述含半纤维素的材料以酶促或非酶促方式水解并且使所获得的水解产物经受包括至少一个酶促步骤的转化,其中糖被释放并且所释放的糖被转化成具有至少一个离子结合位点的化合物。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于转化成具有至少一个离子结合位点的化合物的释放的糖构成

阿拉伯糖、特别是 L-阿拉伯糖,

木糖、特别是 D-木糖,或

阿拉伯糖、特别是 L-阿拉伯糖与木糖、特别是 D-木糖的混合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 中任一项所述的方法,其特征在于所释放的糖、特别是 C5 糖借助于氧化还原酶被转化成内酯、特别是  $\gamma$ -内酯,所述内酯特别是通过酶促水解、非酶促水解和 / 或自发水解被水解成相应的羧酸。

4. 根据权利要求 3 所述方法,其特征在于所述已获得的羧酸特别是借助于脱水酶被脱水成酮基羧酸。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其特征在于所述已获得的酮基羧酸特别是借助于脱水酶进一步被脱水成酮基羧酸半醛。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于所述已获得的酮基羧酸半醛特别是借助于氧化还原酶被氧化成二羧酸。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法,其特征在于

根据权利要求 1 或 2 所述的糖是阿拉伯糖,

根据权利要求 3 所述的内酯是阿拉伯糖酸基- $\gamma$ -内酯,

根据权利要求 3 和 4 所述的羧酸是阿拉伯糖酸,

根据权利要求 4 和 5 所述的酮基羧酸是 2-酮基-3-脱氧阿拉伯糖酸,

根据权利要求 5 和 6 所述的酮基羧酸半醛是  $\alpha$ -酮戊二酸半醛,并且

根据权利要求 6 所述的二羧酸是  $\alpha$ -酮戊二酸。

8. 根据权利要求 2-7 中任一项所述的方法,其特征在于被一种或多种氧化还原酶还原的氧化还原辅因子 NADH 和 / 或 NADPH 在相同的反应批次中借助于至少一种其它氧化还原酶活性、特别是偶合到电极的醇脱氢酶、木糖还原酶、乳酸脱氢酶、氧化酶或一种或多种氧化还原酶被转化成氧化态  $\text{NAD}^+$  和 / 或  $\text{NADP}^+$ 。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于特别是借助于离子交换色谱和 / 或电渗析从所述反应混合物分离已产生并且具有离子结合位点的化合物。

10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的方法,其特征在于所述含半纤维素的材料是从木质纤维素材料获得的。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其特征在于已通过优选在 50°C 到 100°C 的温度下用碱性含水醇溶液处理木质纤维素材料获得所述含半纤维素的材料。

12. 根据权利要求 10 或 11 中任一项所述的方法,其特征在于所述含木质纤维素的材料来源于含木质纤维素的生物质,特别是来源于一年生植物、稻草、能源草、西沙尔麻、甘蔗渣、或非典型木质纤维素基质,例如外皮,特别是稻草或甘蔗渣。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的方法用于从含木质纤维素的材料获得阿拉伯

糖、木糖、特别是阿拉伯糖、阿拉伯糖酸基- $\gamma$ -内酯、阿拉伯糖酸、2-酮基-3-脱氧阿拉伯糖酸、 $\alpha$ -酮戊二酸半醛和 / 或  $\alpha$ -酮戊二酸的用途。

## 用于获得糖衍生物的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于从含半纤维素的材料获得糖衍生物的方法。

### 背景技术

[0002] 近年来,已重新考虑可再生原材料。尝试由化石原材料转向可再生原材料作为能源和化学产品的来源。可再生原材料(“nachwachsender Rohstoff” - 在下面被缩写为“Nawaro”)包括植物或动物起源的不被用作食品或饲料的农业和森林原材料。它可以材料方式利用,而且还可以能量方式利用。Nawaro 具有许多优点,例如保护仅以有限程度提供的化石原材料、足够的可用性以及针对农业中的生产过剩开辟新市场。

[0003] 木质纤维素作为 Nawaro 的重要性正在增加(Kamm 和 Kamm 2004, Appl Microbiol Biotechnol. 64(2):137-45)。它由 3 个不同的化学主要部分组成:纤维素,一种由葡萄糖单元构成的 C6 聚合物;由不同的 C5 糖(例如,木糖)组成的半纤维素;和作为酚聚合物的木质素。一种利用木质纤维素的可能性是气化,使得获得所谓的“合成气平台”。原材料在氧气供应受限的情况下被燃烧以产生富含 CO<sub>2</sub>、CO、H<sub>2</sub>、CH<sub>4</sub>和 N<sub>2</sub>的合成气体以及焦油(Bridgwater, 2003)。合成气体然后可进而被用于例如通过费-托合成(Fischer-Tropsch synthesis)来产生燃料和化学品(Tijmensen 等,2002)。第二种可能性是所谓的“糖平台”。其中,木质纤维素首先被分解成 3 种主要的组分,那些组分然后被进一步转化成产品。木糖可被转化成例如木糖醇或者糠醛。葡萄糖可用于发酵或被转化成羟甲基糠醛(HMF)。木质素常常被用于产生能量或仅仅被燃烧(Saake 和 Lehnen, 2007, 乌尔曼的工业化学百科全书(Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry). Wiley-VCH Verlag GmbH&Co)。

[0004] 在木质纤维素内,所述糖以部分结晶的纤维素和包围所述纤维素的无定形半纤维素的形式提供于紧密交联的聚合结构中。在细胞壁合成的过程中,空腔被木质素填满,由此形成极紧密的复合物。所述结构的紧密性使例如纤维素酶或半纤维素酶的酶不可能到达,由于它们相对高的分子量,因此它们不能进入孔中(Himmel 等, 2007, Science. 315(5813):804-7)。因此,有必要在酶促处理前进行增加木质纤维素的孔隙度的化学步骤。该步骤被称为“预处理”(消化)。在消化中,聚合木质纤维素基质被破坏,由此暴露了纤维素纤维,使得它们变得对于酶可及。消化是被描述为生物精炼中最昂贵的步骤之一的关键步骤(Mosier 等,2005, Bioresour Technol. 96(6):673-86)。另一方面,它还对例如水解、发酵、下游过程的后续步骤以及还有源于所述过程的废物具有非常大的影响(Alvira 等, Bioresour Technol. 101(13):4851-61)。

[0005] 已确定的消化方法的目的主要是液化半纤维素(例如,蒸汽爆破-、稀酸-预处理)或通过液化木质素(例如,石灰-、氨-预处理)实现孔隙度的增加。那些方法表现出一个严重缺点:它们是高耗能的,或者它们主要在略低于 200°C 的温度下进行。或者它们要求昂贵地回收消化化学品。预处理的类型可在后续生物催化过程期间对酶活性和产率具有强烈的影响。在高反应温度下,常常出现毒性分解产物(例如,糠醛),这在直接相关的乙醇发酵的情况下可抑制酵母菌(Chandra 等,2007, Adv Biochem Eng Biotechnol. 108:67-93;

Mansfield 等,1999,Biotechnol Prog. 15(5):804-816)。

[0006] 作为半纤维素,木聚糖是非均质聚合物。半纤维素主要包含戊糖 (C5),例如 D-木糖和 L-阿拉伯糖,但还包含己糖 (C6),例如 D-葡萄糖、D-甘露糖和 D-半乳糖以及还有糖酸,例如葡糖醛酸和 4-O-甲基-D-葡糖醛酸。半纤维素通常具有低于 200 的聚合度 (Jørgensen 等,2007)。半纤维素以构成它们的糖 (例如,麦秸中所含的阿拉伯葡糖醛酸木聚糖) 命名,所述麦秸由木糖主链组成并且含有阿拉伯糖和葡糖醛酸的侧链。另外,木糖单元可分别被乙酸酯和阿魏酸或香豆酸酯化 (Polizeli 等,2005,Appl Microbiol Biotechnol. 67(5):577-91)。对于木聚糖的酶促降解来说,需要内切木聚糖酶、 $\beta$ -木糖苷酶、 $\alpha$ -葡糖醛酸糖苷酶、 $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (arabinofuranidase) 和酯酶 (Polizeli 等,2005,出处同上)。内切木聚糖酶分裂木聚糖主链中的糖苷键并且因此降低底物的聚合度。主要水解产物是  $\beta$ -D-吡喃木糖基低聚物,但还有少量的单糖、二糖和三糖。 $\beta$ -木糖苷酶将低聚木糖裂解成单体木糖。剩余的酶表现出抵抗侧链的活性并且将它们分离。 $\alpha$ -葡糖醛酸糖苷酶将葡糖醛酸残基从主链分离, $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷酶分离阿拉伯糖侧链。酯酶将木聚糖的酯键分裂成侧链,例如乙酸酯或对香豆酸或相应地阿魏酸 (Collins 等,2005,FEMS Microbiol Rev. 29(1):3-23)。侧链的分裂至关重要,使得内切木聚糖酶和  $\beta$ -木糖苷酶可完全分解木聚糖。

[0007] 木聚糖水解用于将糖聚合物裂解成糖低聚物或糖单体。其中,不同目标可有区别。在一些应用中,合理的是将两种糖聚合物 (纤维素和木糖) 都裂解成单体。特别地,在从生物质生产可发酵糖的情况下就是这样。然而,在其它应用中,纤维素应当作为聚合物保存,但木聚糖应当被裂解成低聚物或单体。木聚糖水解可以化学方式或酶促方式发生。此外,木聚糖水解可与木质纤维素材料的分离同时发生或在分开的步骤中发生。

[0008] 在 US 3,523,911 中,描述了如下的化学方法,其中在 100°C 到 150°C 的温度下用酸性蒸气处理生物质,所述酸性蒸气然后在冷凝期间将糖从所述材料中溶解出来。然而,在该方法中,消耗了非常大量的酸,并且获得仅具有非常低浓度的木糖的水解产物。例如,如果基于甘蔗渣的干物质 15% 的木聚糖被水解,则水解产物将仅含有 3% 的木糖,这可归因于在所述过程期间吸收了大量的水。高的酸消耗和用于浓缩糖溶液的成本使得所述方法是无利的。

[0009] 在 US 7,932,063 中,描述了如下的方法,其中首先用含氨水溶液消化生物质。然后使获得的产物与“糖化酶”(一种糖裂解酶) 反应,以获得可发酵的糖。所述酶可包括若干活性,例如糖苷酶、肽酶、脂肪酶、木质酶和酯酶。以这种方式,确保了,如果可能的话,存在的全部糖聚合物都被分解成单体。因此,实现了高糖产率与高糖浓度的水解产物。缺点是水解的非特异性。该方法不涉及仅裂解木质纤维素材料中的木聚糖同时保持纤维素作为聚合物的可能性。

[0010] 在 AT 509 307 A1 中,描述了如下的方法,其中用碳水化合物裂解酶处理已通过碱性醇溶液在低于 100°C 的温度下消化的生物质以获得糖单体。其中,如果使用纯的木聚糖酶作为酶,则仅木聚糖被分解,而纤维素作为聚合物被保存。从木聚糖获得的木糖然后可被木糖还原酶转化成木糖醇而无需从水解产物分离木糖。因此,从预处理的含半纤维素的生物质获得高浓度的 C5 糖。然而,所述方法涉及以下缺点:来自水解的 C5 糖或者还原的后续产物只有在经过巨大努力的情况下才可从反应溶液分离。可溶性木聚糖、低聚木糖和酶或蛋

白质的相应残余物仍然存在于溶液中。从该溶液分离木糖或木糖醇需要结晶。

[0011] 在文献中,使木糖醇从水解产物结晶的方法被描述为由于低浓度而是困难的(Wei等,2010;Frontiers of Chemical Engineering in China 4(1):57-64;Rivas等,2006,Agric Food Chem. 54(12):4430-5)。另外,因为所述水解产物的组成复杂,所以纯化步骤必须在结晶之前进行。Rivas等(2006)描述了如下的方法,其中利用活性炭实现纯化步骤并且然后通过蒸发溶剂实现木糖醇的浓缩。Wei等在通过蒸发溶剂来增加木糖醇的浓度前采用了利用活性炭和离子交换剂的纯化步骤。在两种情况下,通过在冷却时添加乙醇来实现结晶。尤其是通过蒸发溶剂来浓缩木糖醇溶液的成本非常高并且并不最适合工业规模的方法。

[0012] Watanabe等描述了微生物中的阿拉伯糖代谢途径,其中阿拉伯糖独立于磷酸化在5个步骤中被转化成 $\alpha$ -酮戊二酸盐(Watanabe等,2005;Nucleic Acids Symp Ser(Oxf). (49):309-10;Watanabe等J Biol Chem. 281(44):33521-36,2006)。首先,所述糖通过L-阿拉伯糖-1-脱氢酶被氧化成L-阿拉伯糖酸基- $\gamma$ -内酯。在反应期间,所述酶将来自底物的电子分别转移到 $\text{NADP}^+$ 或 $\text{NAD}^+$ 上。通过L-阿拉伯糖酸内酯酶,L-阿拉伯糖酸基- $\gamma$ -内酯被打开以形成L-阿拉伯糖酸盐。所述酶无需辅因子。关于阿拉伯糖酸盐,随后是两个脱水步骤。第一个步骤由L-阿拉伯糖酸盐脱水酶催化,所述酶将L-阿拉伯糖酸盐转化成L-2-酮基-3-脱氧阿拉伯糖酸盐(L-KDA)。L-KDA脱水酶然后将后者转化成 $\alpha$ -酮戊二酸半醛( $\alpha$ -KGS)。这两种脱水酶还在没有可溶性辅因子的情况下催化所述反应(Watanabe等,2006,J Biol Chem. 281(39):28876-88)。最后,半醛然后被 $\alpha$ -KGS脱氢酶氧化成 $\alpha$ -酮戊二酸盐。该酶进而分别需要 $\text{NAD}^+$ 或 $\text{NADP}^+$ ,用于催化氧化(Watanabe等,2006,出处同上)。然而,该转化以这种形式并不适合于工业规模的应用,因为5个步骤中的两个需要化学计量量的辅因子 $\text{NAD(P)}^+$ ,这会产生非常高的成本。

[0013] 在US 2006/0234363A1中,部分地使用了由Watanabe等(2006)描述的阿拉伯糖代谢途径以在微生物中从阿拉伯糖和木糖产生1,2,4-丁三醇。这样,所述糖首先借助于脱氢酶和内酯酶被氧化成内酯并且被水解成相应的酸。然后,细胞中发生C3上的脱水,使得形成D-3-脱氧-甘油基-戊酮糖酸(pentulosonic acid)或相应地L-3-脱氧-甘油基-戊酮糖酸,这取决于所使用的糖。然而,随后发生酸基的脱羧,使得形成D-二羟基丁醛或相应地L-二羟基丁醛。随即,C1上的醛也被还原,使得形成D-1,2,4-丁三醇或相应地L-1,2,4-丁三醇。因为在该应用中,操作发生在整个细胞中,所以对于氧化还原步骤没有必要添加化学计量量的辅因子。然而,一个缺点是,在细胞中通常可以低于无细胞系统中的底物浓度操作。还存在以下事实:如果操作发生在整个细胞中,则所述系统并不是这样有效的,因为所使用的一部分糖促成了生物体的存活,且因此不转化成产物。

[0014] 在US 6,284,904中,描述了如下的方法,所述方法用于去除有机酸,例如来自工业溶液(例如发酵批料或水解产物)的琥珀酸盐。这样,将所述溶液置于阴离子交换器上,在不洗脱有机酸的条件下洗涤所述阴离子交换器。随后,通过添加更强的无机阴离子来洗脱所述有机酸。以这种方式,可以从复合溶液(例如,水解产物)分离并且还可以浓缩有机阴离子。

[0015] 在US 6,187,570中,描述了如下的方法:借助于该方法可通过电渗析从发酵批料或无细胞的生物催化批料分离葡糖酸衍生物。若干阴离子膜和阳离子膜被交替地安装在阴

极与阳极之间。由阴极、阳极和中间膜构成的部件 (block) 被电解质填满。存在引入所述溶液、发酵批料或无细胞的生物催化批料的“进料室”。此外,存在对酸进行浓缩的“浓缩室”。这两个室通过阴离子膜和阳离子膜与彼此分开。如果施加电压,则带负电荷的酸移动穿过阴离子膜进入浓缩室中,而溶液的不带电荷的组分保留在进料室中。以这种方式,葡萄糖或该酸的衍生物分别从中性组分中分离出来并且被浓缩。

[0016] 在 US 5,464,514 中,描述了如下的方法,其中根据糖结合弱酸的不同倾向将它们分离。然后通过电渗析实现分离。选择硼酸作为弱酸。不同的糖具有不同的结合硼酸的倾向。糖和硼酸的复合物带负电荷并且在电场中移动,而不结合硼酸的糖保持不带电荷。电渗析槽由阴极和阳极组成,所述阴极和阳极已被安装在两个阳离子交换膜之间。在这两个阳离子交换膜之间,定位有将间隙划分成 2 个室的阴离子交换膜。室 I 位于阴极侧上,并且室 II 位于阳极侧上。如果现在将待分离的糖溶液引入室 I 中并且施加电压,则带负电荷的离子,即已结合硼酸的糖,移动穿过阴离子交换膜进入室 II 中。不带电荷的糖保留在室 I 中。所述方法已被测试用于分离乳糖和乳果糖以及用于分离葡萄糖和果糖。然而,该方法基于在糖之间存在与硼酸结合的不同亲和力的事实。然而,一部分对硼酸具有较低亲和力的糖也将结合所述酸且因此移动到室 II。因此,仅仅改变糖之间的相互比率不可能分离所述糖。在果糖和葡萄糖的情况下,转移速率的比率是 1.4 到 1。可通过若干电渗析步骤来增强分离。硼酸和糖随后可在又一电渗析步骤中与彼此分离。所述方法具有以下缺陷:适当分离仅可通过许多电渗析步骤产生。另外,该方法未区分单体糖和二聚糖或相应地低聚糖。适当分离仅可在待分离的物质在它们结合硼酸倾向方面非常不同的情况下产生。此外,一个缺陷是对于硼酸来说,必须采用另外(毒性)的组分。

[0017] 在 US 2003/0172850 中,描述了如下的组合物,其充当添加剂以粘合混合物并且含有

[0018] (A) 木质素磺酸或其盐;己醛糖酸(aldohexonic acid)或其盐;己糖醛酸或其盐;己糖二酸或其盐;或其混合物;以及

[0019] (B) 至少一种戊醛糖酸(aldepentonic acid)或其盐。

## 发明内容

[0020] 现已发现允许直接利用在含木质纤维素(或相应地,含半纤维素)的材料水解期间形成的糖的方法。

[0021] 在一个方面,本发明提供用于将来自含半纤维素的材料、特别是从生物质获得的糖转化成具有至少一个离子结合位点的化合物的形式的方法,其特征在于将所述含半纤维素的材料以酶促或非酶促方式水解并且使所获得的水解产物经受包括至少一个酶促步骤的转化,其中糖被释放并且所释放的糖被转化成具有至少一个离子结合位点的化合物。

[0022] 由本发明提供的方法在本文中还被称作“(根据)本发明的方法”。

[0023] 在根据本发明的方法中,含半纤维素的材料的水解和释放的糖转化成具有至少一个离子结合位点的化合物两者可发生在一个反应批次中。这意味着水解产物不必在释放的糖转化成具有至少一个离子结合位点的化合物之前被分离(一锅反应(one-pot reaction))。

[0024] 可用于根据本发明的方法中的含半纤维素的材料可例如通过含木质纤维素的材

料的预处理从木质纤维素材料获得。

[0025] 在根据本发明的方法中，“含木质纤维素的材料”特别包括含木质纤维素的生物质，例如，一年生植物，例如（干）草、或草的部分，优选草、稻草、能源草，例如，柳枝稷、象草或马尼拉麻（abaca）、西沙尔麻（sisal）、甘蔗渣、或非典型木质纤维素基质，例如外皮，例如，外稃，例如米糠，特别优选稻草、能源草、甘蔗渣或外皮，甚至更优选稻草或甘蔗渣。

[0026] 优选例如通过优选在 50°C 到 100°C（例如，100°C 和低于 100°C，优选 85°C 和低于 85°C，特别优选 71°C）的温度下用碱性含水醇溶液进行处理来预处理用于根据本发明的方法中的含木质纤维素的生物质。水溶液中木质纤维素材料的固体含量由此优选达到所述溶液的 1-40 重量%，例如达到 3-30 重量%，并且优选以 1-40 重量%（例如，3-30 重量%，特别是 5-20 重量%）的稠度提供所述固体。优选使用脂肪醇（例如 C<sub>1-6</sub>-醇，特别优选 C<sub>1-4</sub>-醇，例如乙醇或异丙醇）作为用于预处理的醇。可利用碱（优选无机碱，例如，氢氧化物，例如苛性苏打碱水、苛性钾）来调节醇溶液的优选在 10 到 14 范围内的 pH 值。反应期间的碱浓度通常在 1mol L<sup>-1</sup>到 10mol L<sup>-1</sup>、优选 2mol L<sup>-1</sup>到 6mol L<sup>-1</sup>、甚至更优选 4.5mol L<sup>-1</sup>到 5.5mol L<sup>-1</sup>的范围内。优选用于根据本发明的方法中的含木质纤维素的材料预处理的所述特定实施方案基于以下认识：已用包含醇、特别是 C<sub>1-6</sub>-醇并且具有 10.0 到 14.0 的 pH 值的含水碱性溶液处理并且富集纤维素和半纤维素的材料是比根据不同实施方案预处理的材料更易于酶促降解成碳水化合物裂解产物的材料。

[0027] 用于根据本发明的方法中的含木质纤维素的材料或相应地含半纤维素的材料经受酶促水解或非酶促水解、优选酶促水解。用于获得含糖的水解产物的非酶促水解可根据常规方法进行，例如，通过酸催化的水解进行。对于可根据已知方法进行的酶促水解来说，使用了合适的酶，例如，内切木聚糖酶、β-木糖苷酶、α-阿拉伯呋喃糖苷酶、葡糖醛酸糖苷酶、纤维素酶和所述酶的混合物。

[0028] 在根据本发明的方法中，例如在如上文所述的预处理后获得的含半纤维素的材料优选以干物质重量计 1-40% 的稠度用于水溶液中。

[0029] 具有至少一个离子结合位点的化合物包括具有至少一个适合成盐的离子结合位点（例如，式 - (COO<sup>-</sup>)<sub>n</sub>R<sup>n+</sup> 的酸基）的化合物，其中 R 表示氢或阳离子，例如，碱金属阳离子或碱土金属阳离子，例如，Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>++</sup>，并且 n 表示阳离子所表现的并且取决于其化合价的电荷。根据本发明的方法中被转化成具有至少一个离子结合位点的化合物的释放的糖优选为阿拉伯糖，例如，L-阿拉伯糖，和 / 或木糖，例如，D-木糖。

[0030] 在另一方面，本发明提供根据本发明的方法，其特征在于转化成具有至少一个离子结合位点的化合物的释放的糖构成

[0031] 阿拉伯糖、特别是 L-阿拉伯糖，

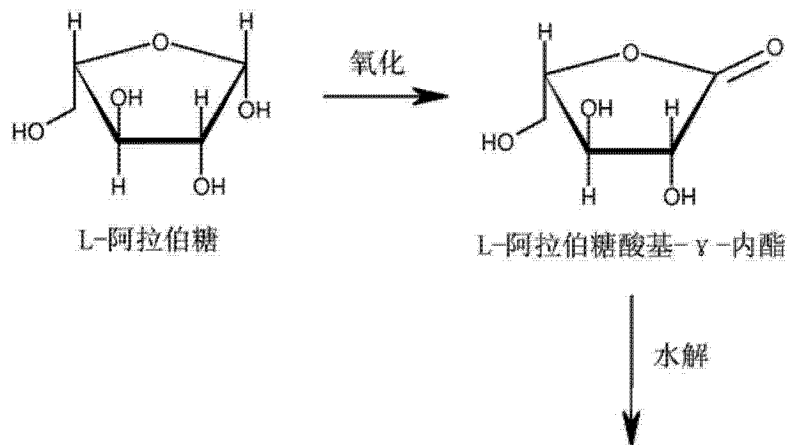
[0032] 木糖、特别是 D-木糖，或

[0033] 阿拉伯糖、特别是 L-阿拉伯糖与木糖、特别是 D-木糖的混合物。

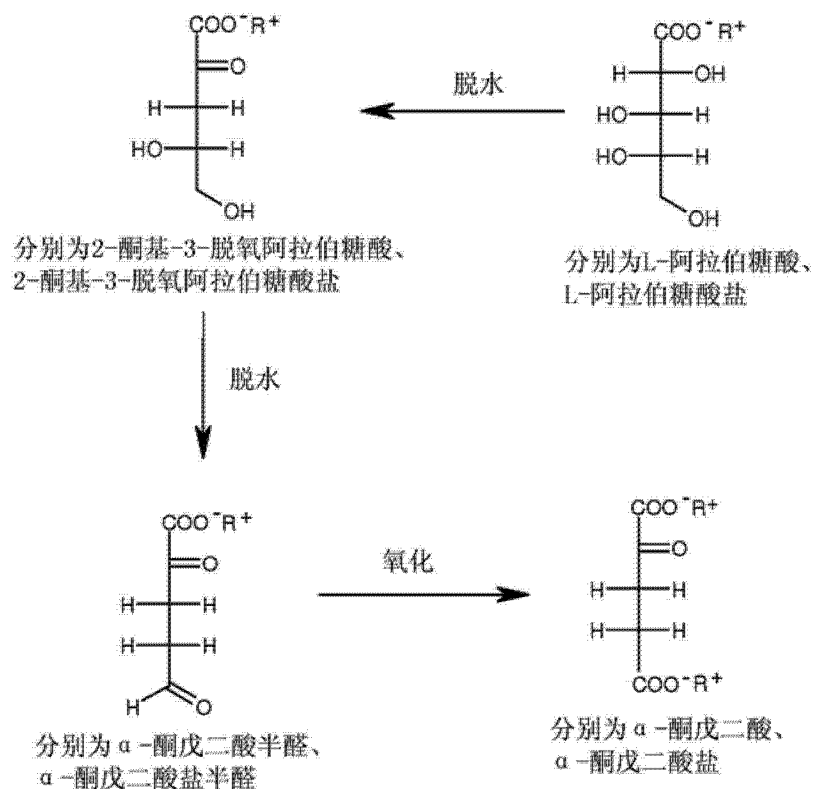
[0034] 糖转化成具有至少一个离子结合位点的化合物的形式以酶促方式发生并且可例如根据以下反应方案 1 发生，其中显示阿拉伯糖通过酶促氧化转化成 α-酮戊二酸并且水解成阿拉伯糖酸，也就是说，所述糖转化成表现酸基的化合物。如果需要，可通过例如以氢氧化物（例如 NaOH、KOH、Ca(OH)<sub>2</sub>）的形式添加适当的阳离子将所述酸基可转化成盐。反应方案 1 中的 R<sup>+</sup>意指氢，或如在所说明的情况下意指单价阳离子，例如 Na<sup>+</sup> 或 K<sup>+</sup>。

[0035] 反应方案 1

[0036]



[0037]



[0038] 在根据本发明的方法中,一个优点是通过水解释放的糖(由于酶促处理而以具有至少一个离子结合位点的化合物的形式提供)可通过施用另外的特异性酶直接在水解产物中被转化成所需的最终产物。在上文所示的反应方案中,这是以如下举例方式说明的:阿拉伯糖酸转化成  $\alpha$ -酮戊二酸或相应地在它作为盐提供的情况下转化成  $\alpha$ -酮戊二酸盐,这构成了有机化学中有价值的产物。在所说明的情况下,催化关于阿拉伯糖酸或相应地其次级产物的特异性脱水反应的酶可用于该目的。

[0039] 在根据本发明方法的优选实施方案中,糖、优选 C5 糖酶促转化成具有离子结合位点的化合物是借助于氧化还原酶进行的,被转化成相应的内酯、优选  $\gamma$ -内酯。为了获得相应的酸,将所获得的内酯水解,其中所述水解可以酶促方式、非酶促方式和/或通过自发水解发生。

[0040] 例如,戊糖脱氢酶组合例如内酯酶和 / 或组合例如碱性水解、优选组合氢氧化物(例如,氢氧化钠),由此将内酯裂解成相应的酸,适合作为用于氧化 C5 糖的氧化还原酶。

[0041] 在又一方面,本发明提供根据本发明的方法,其特征在于释放的糖、特别是 C5 糖(例如,阿拉伯糖)借助于氧化还原酶被水解成内酯,优选  $\gamma$ -内酯,例如,阿拉伯糖酸基- $\gamma$ -内酯,所述内酯特别是通过酶促水解、非酶促水解和 / 或自发水解被水解成相应的羧酸,例如,阿拉伯糖酸。

[0042] 为了获得特定的所需化合物,所获得的羧酸(例如,阿拉伯糖酸)随后可例如借助于脱水酶(在 L-阿拉伯糖酸的情况下,例如,借助于 L-阿拉伯糖酸盐脱水酶)在所需位置(在 C5 羧酸的情况下,例如,在 C3 位置)被脱水,使得形成相应的酮基羧酸,例如,在(L-)阿拉伯糖酸的情况下,形成(L-)2-酮基-3-脱氧阿拉伯糖酸。如果需要,所获得的酮基羧酸可例如使用脱水酶例如在 C5 羧酸的情况下在 C4 位置进一步被脱水,使得形成酮基羧酸半醛,例如,在(L-)2-酮基-3-脱氧阿拉伯糖酸的情况下,使用  $\alpha$ -酮戊二酸半醛的 L-2-酮基-3-脱氧阿拉伯糖酸盐脱水酶进行。如果需要,所获得的酮基羧酸半醛可例如借助于氧化还原酶被氧化以获得二羧酸;在  $\alpha$ -酮戊二酸半醛的情况下,例如,借助于  $\alpha$ -酮戊二酸盐半醛脱氢酶被氧化,以获得  $\alpha$ -酮戊二酸。

[0043] 在又一方面,本发明提供根据本发明的方法,其特征在于已根据本发明获得的羧酸(例如,阿拉伯糖酸)例如借助于脱水酶被脱水成酮基羧酸,例如,2-酮基-3-脱氧阿拉伯糖酸,并且特征在于,在又一方面,已根据本发明获得的酮基羧酸例如借助于脱水酶进一步被脱水成酮基羧酸半醛,例如,  $\alpha$ -酮戊二酸半醛,并且特征在于,在又一方面,已根据本发明获得的酮基羧酸半醛例如借助于氧化还原酶被氧化成二羧酸,例如,  $\alpha$ -酮戊二酸。

[0044] 在根据本发明的方法中,“酮基羧酸半醛”应理解为如下的脂肪族化合物,其中一个末端 C 原子作为羧基提供,不同的末端 C 原子作为甲酰基提供并且剩余 C 原子之一作为酮基提供。

[0045] 已被一种或几种氧化还原酶还原的氧化还原辅因子 NADH 和 / 或 NADPH 可借助于至少一种其它氧化还原酶活性,优选在相同的反应批次中被转化成氧化态  $\text{NAD}^+$  和 / 或  $\text{NADP}^+$ 。关于这一点,  $\text{NAD}^+$  表示烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的氧化形式并且 NADH 表示烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的还原形式,而  $\text{NADP}^+$  表示烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸的氧化形式并且 NADPH 表示烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸的还原形式。为了将还原的辅因子转化成氧化形式,偶合到电极的醇脱氢酶、木糖还原酶、乳酸脱氢酶、氧化酶、氧化还原酶,例如偶合到电极的醇脱氢酶、乳酸脱氢酶、氧化酶或氧化还原酶适合例如作为氧化还原酶活性。

[0046] 在又一方面,提供根据本发明的方法,其特征在于被一种或几种氧化还原酶还原的氧化还原辅因子 NADH 和 / 或 NADPH 在相同的反应批次中借助于至少一种其它氧化还原酶活性、特别是偶合到电极的醇脱氢酶、乳酸脱氢酶、木糖还原酶、氧化酶或一种或几种氧化还原酶被转化成氧化态  $\text{NAD}^+$  和 / 或  $\text{NADP}^+$ 。

[0047] 通过在相同的反应批次中使用一种或几种氧化还原酶活性将还原的氧化还原辅因子 NADH 和 / 或 NADPH 转化回氧化态  $\text{NAD}^+$  和 / 或  $\text{NADP}^+$ , 避免了使用大量高成本的氧化还原辅因子,从而使得所述方法变得节约。

[0048] 根据本发明的方法的又一优点是来自含半纤维素的生物质的水解的水解产物可直接用于单体糖的转化而无需对其进行纯化或浓缩。单体糖的转化可直接发生在糖(例

如,不同的糖,任选地非水解的糖聚合物)与此外任选地仍然存在的固体的混合物中。所述方法的又一优点是单体糖可通过转化成具有至少一个离子结合位点的化合物非常容易地从水解产物分离并浓缩。以这种方式,可容易地将它们与其它组分分离,所述其它组分例如可为未转化的木聚糖或低聚木糖。通过选择适当的酶,也具体地仅 C5 糖或仅 C6 糖可被转化和分离,而所有其它糖均保留在所述溶液中。在根据本发明的方法中,优选 C5 糖被转化。

[0049] 在根据本发明的方法中,可通过分离方法降低已产生并且具有离子结合位点的化合物在所述混合物中的浓度。所述分离方法的示例包括离子交换色谱(例如,阴离子交换色谱)和/或电渗析。

[0050] 在又一方面,本发明提供根据本发明的方法,其中特别是借助于离子交换色谱和/或电渗析从反应混合物分离已产生并且具有离子结合位点的化合物。

[0051] 因此,已经产生并且具有离子结合位点的化合物在所述混合物中的浓度降低。

[0052] 所述分离可在提供具有离子结合位点的化合物的同时发生在根据本发明的方法中的任何点。

[0053] 在根据本发明的方法中未转化的糖可经受例如进一步酶促和/或非酶促方法。

[0054] 在又一方面,本发明提供根据本发明的方法用于从含木质纤维素的材料获得阿拉伯糖、木糖、特别是阿拉伯糖、阿拉伯糖酸基- $\gamma$ -内酯、阿拉伯糖酸、2-酮基-3-脱氧阿拉伯糖酸、 $\alpha$ -酮戊二酸半醛和/或 $\alpha$ -酮戊二酸的用途。

## 具体实施方式

[0055] 在以下实施例中,以摄氏度( $^{\circ}\text{C}$ )表示温度。

[0056] 实施例 1

[0057] 含半纤维素的材料的酶促水解

[0058] 将木聚糖以 8% (w/v) 的浓度悬浮于具有 pH 4.3 的乙酸盐缓冲液中并且与 Genencor 公司的 ACCELLERASE<sup>®</sup> TRI0<sup>™</sup>以 1g 酶溶液/1g 木聚糖的浓度混合。将所述批料在 50 $^{\circ}\text{C}$  搅拌 24h。检查 pH 值并且在高于 4.5 或低于 4.1 的偏差的情况下进行重新调节。通过布氏漏斗(Büchner funnel)将所述批料过滤并且借助于 HPLC-LEX-DAD 分析滤液(水解产物)的单体组成以及所述单体的浓度。所述滤液中含有约 6% 浓度的木糖、0.43% 浓度的阿拉伯糖和 0.27% 浓度的葡萄糖。以这种方式,以单体形式获得约 85% 的于木聚糖中获得的木糖。

[0059] 实施例 2

[0060] 通过 HPLC 分析水解产物

[0061] 将 500  $\mu\text{l}$  的根据实施例 1 的木聚糖水解释液离心,然后使上清液通过 0.2  $\mu\text{M}$  PVDF(聚偏二氟乙烯)过滤器并且借助于 HPLC-LEX-RID(Agilent Technologies 公司)进行分析。由此通过 Shodex Denko K. K. 的导柱(lead column)(Shodex<sup>®</sup> Sugar SP0810)以 0.5ml/min 的水(VWR:HPLC 级)流在 80 $^{\circ}\text{C}$  分离所述糖。借助于 Agilent RID 实现检测。使用了 Agilent Technologies 公司的在线过滤器(inline filter)以及作为前置柱的反相柱(Axpak-WA-G)、阴离子交换柱(Shodex<sup>®</sup> Asahipak<sup>®</sup> ODP-506E)和糖前置柱(Shodex<sup>®</sup> SP-G),均由 Showa Denko K. K. 供应。

[0062] 实施例 3

[0063] 通过阿拉伯糖脱氢酶将 L-阿拉伯糖氧化成阿拉伯糖酸盐、以及通过醇脱氢酶使辅因子再循环和随后通过苛性苏打碱水将内酯水解

[0064] 0.5ml 批料含有 50mg/ml 的阿拉伯糖、5U/ml 来自越南伯克氏菌 (*Burkholderia vietnamiensis*) 的重组阿拉伯糖脱氢酶以及 0.5mM NADP<sup>+</sup>与 0.5mM NADPH 的混合物。对于辅因子的再生来说,添加 2.5% (w/v) 丙酮和 5U/ml 来自高加索乳杆菌 (*Lactobacillus kefir*) 的重组醇脱氢酶。所述酶以细胞溶解产物的形式使用。所述反应在 40°C 和 pH 10 在连续振荡 (900rpm) 下发生 24h。24h 后,将反应容器在 60°C 孵育 10min 以灭活所述酶。随后,添加 5 μl 的 2M NaOH。

[0065] 以这种方式,将超过 60% 的 L-阿拉伯糖转化成 L-阿拉伯糖酸钠。利用 GC-MS 实现分析。

[0066] 实施例 4

[0067] 通过阿拉伯糖脱氢酶将 L-阿拉伯糖氧化成阿拉伯糖酸盐、以及通过醇脱氢酶使辅因子再循环和随后通过内酯酶将内酯水解

[0068] 0.5ml 批料含有 50mg/ml 的阿拉伯糖、5U/ml 来自越南伯克氏菌的重组阿拉伯糖脱氢酶以及 0.5mM NADP<sup>+</sup>与 0.5mM NADPH 的混合物。对于辅因子的再生来说,添加 2.5% (v/v) 丙酮和 5U/ml 来自高加索乳杆菌的重组醇脱氢酶。所述酶以细胞溶解产物的形式使用。所述反应在 40°C 和 pH 10 在连续振荡 (900rpm) 下发生 24h。24h 后,将反应容器在 60°C 孵育 10min 以灭活所述酶。在冷却后,添加 50 μl 的大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞溶解产物与来自巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasiliense*) 的过表达的 L-阿拉伯糖酸内酯酶,并且将所述反应在 40°C (900rpm) 再振荡 24h。随后,将反应容器在 60°C 孵育 10min 以灭活所述酶。

[0069] 以这种方式,将超过 65% 的 L-阿拉伯糖转化成 L-阿拉伯糖酸盐。利用 GC-MS 实现分析。

[0070] 实施例 5

[0071] 借助于 GC-MS 分析氧化反应

[0072] 对于在 GC-MS 上对氧化反应的分析来说,必须对基质和产物进行衍生化。将批料离心,通过 0.2 μm PVDF 过滤器并且以 1:30 稀释。将 20 μl 的稀释物转移到 0.5ml 小瓶中并且在 Speedvac 中干燥。对于衍生化来说,然后添加 150 μl 吡啶和 N, O-双(三甲基甲硅烷基)-三氟乙酰胺与三甲基氯硅烷的 50 μl 99:1-混合物。作为内标,山梨醇以 0.1mg/ml 的浓度含于吡啶中。衍生化在 60°C 发生 16h。随后,通过 GC-MS 分析样品。这样,通过分离柱 HP-5ms (5% - 苯基)-甲基聚硅氧烷在气相色谱仪中分离样品并且利用 Shimadzu 质谱仪 GCMS QP210Plus 对样品进行分析。

[0073] 实施例 6

[0074] 将木糖与阿拉伯糖的混合物中的阿拉伯糖转化成阿拉伯糖酸盐 / 阿拉伯糖酸内酯

[0075] 将 180mg D-木糖和 20mg L-阿拉伯糖与 2U 来自越南伯克氏菌的 L-阿拉伯糖脱氢酶以及 2U 来自近平滑念珠菌 (*Candida parapsilosis*) 的 D-木糖还原酶一起溶解于 50mM 的含水 Tris 缓冲液 (pH = 7.0 在 25°C) 中到 500 μl 的总体积。所述反应在 40°C 的封闭反应容器中在搅动 (900rpm, Eppendorf Thermomix®) 下发生。30min 后,通过在 65°C 孵

育 15 分钟将酶灭活,通过离心 (21000g, 5min) 分离变性蛋白质,并且借助于 GC-MS 对糖进行定量。所用的 L-阿拉伯糖完全转化,其 92%转化成 L-阿拉伯糖酸盐或 L-阿拉伯糖酸基- $\gamma$ -内酯并且剩余的 8%转化成 L-阿拉伯糖醇。所用 D-木糖的约 89.5%保持不变,而 10.4%转化成木糖醇。所用 D-木糖的 <0.1%氧化成 D-木糖酸盐 /D-木糖酸基- $\gamma$ -内酯。

[0076] 如在该情况下实现的阿拉伯糖向阿拉伯糖酸盐 / 阿拉伯糖酸内酯的相对选择性的转化源于阿拉伯糖脱氢酶相比于木糖对阿拉伯糖的更高比活性,源于阿拉伯糖与木糖在反应混合物中的相对比例以及源于有限的酶活性 / 反应时间。

[0077] 所述实施例尤其显示,可借助于根据本发明的方法从糖混合物分离特定糖。