



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118024** (13) **C2**
(51) МПК**C12P 19/14** (2006.01)**C12P 19/02** (2006.01)**C13K 1/02** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2015 07857	(72) Винахідник(и):	Смітс Йоханнес Петрус (NL), Беркхаут Міхаел Петрус Йозеф (NL), Нордам Бертус (NL)
(22) Дата подання заявки:	09.01.2014	(73) Власник(и):	ДСМ АйПі АСЕТС Б.В., Het Overloon 1, NL-6411 TE Heerlen, The Netherlands (NL)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	12.11.2018	(74) Представник:	Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	13150932.5	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Thermostable endoglucanases in the liquefaction of hydrothermal 1 y pretreated wheat straw / Szijarto N., Horan E., Zhang J. et al. // Biotechnology for Biofuels. – 2011. – Vol.4. – № I. – P. 1-10. WO 2010/137039 A2, 02.12.2010. WO 2005/118828 A1, 15.12.2005. US 2009/098616 A1, 16.04.2009. WO 2011/080154 A1, 07.07.2011. Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse / Mesa L, Gonzalez E., Romero I. et al. // Chemical Engineering Journal. – 2011. – Vol. 175. – P. 185-191, WO 2007/091231 A1, 16.08.2007. WO 2011/000949 A1, 06.01.2011.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	11.01.2013		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.09.2015, Бюл.№ 18		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	12.11.2018, Бюл.№ 21		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2014/050271, 09.01.2014		

(54) СПОСІБ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГІДРОЛІЗУ ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНОГО МАТЕРІАЛУ**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу гідролізу біомаси целюлози, який передбачає етап скраплення, на якому додають перший фермент або першу ферментну композицію з метою розрідження щонайменше частини твердих часток, які присутні у біомасі з отриманням коефіцієнта зниження в'язкості, який дорівнює щонайменше 2, за яким іде етап оцукрювання, на якому додають другу ферментну композицію з метою формування олігомерних та/або мономерних цукрів; причому перший фермент/ферментна композиція включає ендоглюканазу, а друга композиція містить фермент целюлази. Вміст сухої речовини на етапі скраплення становить 15 мас. % або вище, а етап скраплення та оцукрювання здійснюють при температурі 60 °C або вище.

UA 118024 C2

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Винахід відноситься до способу ферментативного гідролізу лігноцелюлозного матеріалу.

Передумови до створення винаходу

Лігноцелюлозний рослинний матеріал, який також називається у даній заявці вихідною сировиною або матеріалом, який містить целюлозу, є поновлюваним джерелом енергії у вигляді цукрів, які можуть бути перетворені на цінні продукти, наприклад біопаливо, таке як біоетанол. При здійсненні цього способу, (лігно- або гемі)целюлозу, що присутня у вихідній сировині, такий як пшенична солома, кукурудзяна солома, рисова лушпайка тощо, за допомогою ферментів, що впливають на (гемі)целюлозу, перетворюють на редуруючі цукри, які потім перетворюють на цінні продукти, такі як етанол, за допомогою мікроорганізмів, таких як дріжджі, бактерії й гриби.

Оскільки (гемі) целюлоза є кристалічною речовиною, яка в своїй решітці містить лігнін, то перетворення на редуруючі цукри в цілому протікає повільно й не повністю. Як правило, ферментативний гідроліз необробленої вихідної сировини дає вихід за цукрами < 20 % від теоретичної кількості. Після застосування хімічної та термофізичної попередньої обробки, (гемі)целюлоза стає більш доступною для дії розкладаючих целюлозу ферментів, і, таким чином, перетворення протікає швидше й дає більш високі результати.

Типовий вихід етанолу із глюкози, отриманої з попередньо обробленої кукурудзяної соломи, дорівнює 40 галонам етанолу на 1000 кг сухої кукурудзяної соломи (Badger, P, Ethanol from cellulose: a general review, Trends in new crops and new uses, 2002, J. Janick and A. Whipkey (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA) або 0,3 г етанолу на г вихідної сировини. Максимальний вихід етанолу відносно целюлози дорівнює приблизно 90 %.

Розкладаючі целюлозу ферменти – більшість із них продукуються такими видами як *Trichoderma*, *Humicola* і *Aspergillus* – комерційно застосовують для перетворення попередньо обробленої вихідної сировини в пюре, яке містить нерозчинну (гемі)целюлозу, отримані з неї редууючі цукри й лігнін. Це пюре потім використовують для ферментації, у ході якої редууючі цукри перетворюються в дріжджову біомасу (клітини), вуглекислий газ і етанол. Етанол, отриманий таким чином, називають біоетанолом.

Гідроліз, який є поширеним способом одержання цукрів з попередньо обробленої лігноцелюлозної вихідної сировини, також називають розрідженням, попереднім оцукрюванням або оцукрюванням, як правило, відбувається в ході процесу, що триває 6-168 годин (Kumar S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526; Murray P. et al., Enzyme Microbial Technol 29 (2001) 90-98); при підвищених температурах 45-50 °C (Kumar S., Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526) і нестерильних умовах. Протягом цього гідролізу, целюлоза, яка присутня, частково (як правило, 30-95 %, залежно від активності ферменту й умов гідролізу) перетворюється в редууючі цукри. У випадку інгібування ферментів сполуками, що присутні в попередньо обробленій вихідній сировині й цукрами, що вивільнилися, і для того, щоб звести до мінімуму теплову інактивацію, даний період підвищення температури зводять до мінімуму, наскільки це можливо.

Ферментація, що слідує за гідролізом протікає в одній окремої, переважно анаеробної, стадії способу, або в тій же самій, або в іншій ємності, у якій температуру знижують до 30-33 °C (мезофільний спосіб) для пристосування до росту біомаси мікроорганізмів і продукування нею етанолу, як правило, дріжджами. У ході даного способу ферментації (гемі)целюлозний матеріал, що залишився, перетворюється в редууючі цукри під дією ферментів, уже присутніх зі стадії гідролізу, у той час як виробляється біомаса мікроорганізмів і етанол. Цей тип ферментації, тому часто називають Одночасне (Simultaneously) Оцукрювання (Saccharification) й Ферментація (Fermentation), ООФ (SSF). Ферментацію закінчують у той момент, коли (гемі)целюлозний матеріал перетворюється у ферментовані цукри, а всі ферментовані цукри перетворюються в етанол, вуглекислий газ і клітини мікроорганізмів.

Отримане у такий спосіб ферментоване пюре складається з неферментованих цукрів, негідролізованого (гемі)целюлозного матеріалу, лігніну, клітин мікроорганізмів (найчастіше дріжджових клітин), води, етанолу, розчиненого вуглекислого газу. Під час цих послідовних стадій етанол відганяють із пюре й додатково очищують. Суспензію твердих речовин, що залишилися, висушують і застосовують у якості, наприклад, пального, добрива або корму для худоби.

З кожною партією вихідної сировини додають ферменти для того, щоб зробити максимальним вихід і швидкість одержання зброджуваних цукрів, які вивільняються з попередньо обробленої лігноцелюлозної вихідної сировини протягом заданого способу часу. У цілому, витрати на виробництво ферментів, на сировину для виробництва етанолу й інвестиції є основними факторами витрат у загальних витратах на виробництво (Kumar, S. Chem. Eng. Technol. 32 (2009) 517-526). Досі, зниження внеску ферментів у вартість досягали шляхом застосування ферментних препаратів з одного або з декількох мікробних джерел (WO

2008/008793) з більш широкою й/або високою (специфічною) гідролітичною активністю, застосування яких було спрямоване на зниження потреби у ферментах, підвищення швидкостей перетворення й/або підвищення виходів при перетворенні, і, таким чином, на зниження сумарних витрат при одержанні етанолу в цілому. Це вимагає більших інвестицій у науково-дослідні розробки даних ферментних продуктів. У випадку, коли ферментний продукт складається з ферментів, що походять з декількох мікробних джерел, необхідні великі капітальні інвестиції для виробництва кожної окремої ферментної сполуки.

Тому бажано вдосконалити наведений вище спосіб, що включає гідроліз і ферментацію.

Термостабільні целюлолітичні ферменти, отримані з *Talaromyces*, були використані для розкладання лігноцелюлозної сировини і дані ферменти відомі своєю термостабільністю, з WO2007091231. Проте, не розкривається як оптимізувати процес гідролізу й ферментації.

Розкриття винаходу

Завданням даного винаходу є представлення способу гідролізу біомаси целюлози, який включає

- етап скраплення, на якому додають перший фермент або першу ферментну композицію з метою розрідження щонайменше частини твердих часток, що присутні у біомасі й збереження в'язкості біомаси целюлози, нижче 1000 cP, бажано нижче 800 cP, і іще краще нижче 600 cP на стадії скраплення;

- етап оцукрювання, на якому додають другу ферментну композицію з метою формування олігомерних і/або мономерних цукрів; і

причому перший фермент або перша ферментна композиція відрізняється від другої ферментної композиції;

причому перший фермент або перша ферментна композиція включає ендоглюканазу;

причому друга композиція містить фермент целюлази; і

причому перший фермент або перша ферментна композиція містить більше, за другу ферментну композицію ендоглюканази (вираженої в% мас. білку).

Іншим завданням даного винаходу є створення способу гідролізу біомаси целюлози, який включає

- етап скраплення, на якому додають перший фермент або першу ферментну композицію з метою розрідження щонайменше частини твердих часток, що присутні у біомасі й зменшення коефіцієнту в'язкості до щонайменше 2, щонайменше 4, щонайменше 6, щонайменше 10, і принаймні 15 або, принаймні 20 на стадії скраплення;

- етап оцукрювання, на якому додають другу ферментну композицію з метою формування олігомерних і/або мономерних цукрів; і

причому перший фермент або перша ферментна композиція відрізняється від другої ферментної композиції;

причому перший фермент або перша ферментна композиція включає ендоглюканазу;

причому друга композиція містить фермент целюлази; і

причому перший фермент або перша ферментна композиція містить більше ендоглюканази, чим друга ферментна композиція(вираженої в % мас. білку).

Переважно стадія скраплення відбувається в реакторі (реакторі скраплення), який має об'єм менший за об'єм реактора у якому відбувається етап оцукрювання (реактор оцукрювання), бажаним співвідношенням об'єму реактора скраплення й об'єму реактора оцукрювання становить від 1:2 до 1:50, краще від 1:3 до 1:40.

Стосовно іншого варіанту втілення даного винаходу реактор скраплення й / або реактор оцукрювання мають мати об'єм більший за 1 м³, бажано мають мати об'єм від 10 до 5000 м³.

Переважно на стадії скраплення чи в реакторі скраплення менше ферменту (на суху речовину білка) на одиницю об'єму реактора, чим додається на етапі, на якому формуються олігомерні й / або мономерні цукри чи в реакторі мономерного гідролізу цукру.

Відповідно до іншого варіанту втілення даного винаходу друга ферментна композиція містить щонайменше два різні целобіогідролази й необов'язково бета-глюкозидази й/або GH61.

Бажано, щоб перший фермент або перша ферментна композиція і/або другий фермент або ферментна композиція містили термостійкий фермент.

Відповідно до бажаного варіанта втілення етап скраплення здійснюється з підживленням, в напівбезперервному або безперервному режимі, краще в безперервному режимі.

Відповідно до іншого бажаного варіанту етап оцукрювання здійснюється з підживленням, в напівбезперервному або серійному режимі, краще в серійному режимі або в режимі з підживленням.

На стадії скраплення бажано, щоб вміст сухої речовини був 5 % мас. або більше, 8 % мас. або більше, 10 % мас. або більше, 11 % мас. або більше, 12 % мас. або більше, 13 % мас. або

більше, 14 % мас. або більше, 15 % мас. або більше, 20 % мас. або більше, 25 % мас. або більше, 30 % мас. або більше, 35 % мас. або більше або 40 % мас. або більше, і бажано менше 42 % мас...

Етап скраплення переважно здійснюють за температури 50 °C або вище, 55 °C або вище, 60 °C або вище, 65 °C або вище, або 70 °C або вище, переважно етап скраплення проводять за температури між 65° C і 110 °C, ще краще між 65 °C і 90 °C, і ще краще між 65 °C і 80 °C і найкраще між 70 °C і 80 °C.

Короткий опис фігур

Фігура 1: ефект попереднього скраплення з ендоглюканази.

Фігура 2: зменшення в'язкості при скрапленні лігноцелюлозної сировини за різних температур (◆ = 62°C, ▲ = 70°C і ● = 75°C).

Докладний опис винаходу

Даний винахід спрямований на зниження експлуатаційних витрат, таких як витрати на ферменти, витрати на реактори і енергетичні витрати, у способі гідролізу біомаси целюлози. Витрати на ферменти можуть бути зменшені при використанні меншої кількості ферментів і в той же час зберігаючи високі виробничі результати, такі як високий рівень цукру, етанолу, біогазу або інших необхідних продуктів, усе в порівнянні з відомими способами гідролізу. Витрати на реактор можуть бути знижені шляхом вибору умов процесу, які призводять до зниження загального об'єму реактора в порівнянні з відомими способами гідролізу. Економія енергії може бути досягнута відповідно до винаходу з більш низькими потребами в подачі енергії в процесі по винаходу.

Лігноцелюлозна сировина

Тут лігноцелюлозний матеріал включає в собі будь-який лігноцелюлозний й / або геміцелюлозний матеріал. Лігноцелюлозний матеріал, придатний для використання як сировина або матеріал, що містить целюлозу, яку за винаходом, включає біомаса, наприклад необроблену біомаса й / або оброблену біомаса, така як сільськогосподарська біомаса, комерційна органіка, будівниче сміття, брукт, тверді побутові відходи, макулатура й садові відходи. До поширених видів біомаси відноситься біомаса дерев, чагарників і трав, пшениця, пшенична солома, витяжка з цукрового очерету, просо, міскантус, кукурудза, кукурудзяні стебла, лушпиння кукурудзи, качани кукурудзи, стебла рапсу, стебла сої, сорго, зерна кукурудзи в тому числі волокна від зерна, продукти й побічні продукти від перемелення зерен, кукурудзи, пшениці і ячменю (у тому числі мокрого помолу й сухого помолу), які часто називають "висівки або волокна", а також тверді побутові відходи, макулатура й садові відходи. Біомасою також можуть бути, але не виключно, трав'яний матеріал, сільськогосподарські відходи, відході лісового господарства, муніципальні тверді відходи, макулатура, і целюлозно-паперові фабричні відходи. "Сільськогосподарська біомаса" включає гілки, кущі, очерет, кукурудзу й кукурудзяне лушпиння, енергетичні культури, деревену, фрукти, квіти, зерно, траву, трав'янисті культури, листя, кору, хвою, колоди, коріння, саджанці, короткі деревні культури, чагарники, трави середнього ярусу, дерева, овочі, фруктові шкурки, виноград, пульпу цукрового буряка, пшеничні висівки, основи вівса і тверді й м'які породи дерева (за виключенням деревини зі шкідливими речовинами). Крім того, сільськогосподарська біомаса включає матеріали органічних відходів, отримані із сільськогосподарських процесів, включаючи сільськогосподарські і лісгосподарські види діяльності, і особливо відходи лісової деревини. Сільськогосподарською біомасою може бути кожне з вищезгаданих окремо або в будь-якій комбінації або суміші.

Попередня обробка

Сировина необов'язково має бути попередньо піддана термічній, механічно мікробіологічній чи ферментативній обробці і/або хімічній модифікації чи будь-якій комбінації таких способів за для підвищення доступності субстрату для ферментативного гідролізу й / або гідролізу геміцелюлози й / або солюбілізації геміцелюлози й / або целюлози й / або лігніну, будь-яким способом, відомим у даній галузі. В одному з варіантів втілення, попередня обробка поєднує обробку лігноцелюлози гарячою парою, обробку гарячою водою або обробку розведеною кислотою або розведеною основою.

Етап промивання

Згідно з винаходом спосіб необов'язково має містити у собі етап промивання. За необхідності етап промивання може бути реалізований, з метою вилучення водорозчинних сполук, які можуть діяти, як інгібітори на стадії ферментації. Етап промивання можна здійснювати будь-яким з відомих способів.

Етап скраплення

Згідно з винаходом спосіб включає етап скраплення сировини. На цьому етапі, за необхідності попередньо оброблена і за необхідності промита лігноцелюлозна сировина піддається впливу першого ферменту або першої композиції ферментів.

Залежно від лігноцелюлозного матеріалу й попередньої обробки, різні умови реакції, наприклад, температура, доза ферменту, час реакції гідролізу й концентрація сухої речовини, можуть бути адаптовані фахівцем у даній галузі, з метою досягнення бажаної конверсії лігноцелюлози. Деякі вказівки викладені нижче.

Бажано, щоб на етапі скраплення додавався перший фермент або перша ферментна композиція для розрідження щонайменше частини твердих часток, які присутні у біомасі й збереження в'язкості біомаси целюлози, на цьому етапі нижче 1000 сР, бажано нижче 800 сР, і іще краще нижче 600 сР. Целюлоза, що міститься в біомасі на цьому етапі бажано має мати вміст сухої речовини від 12 до 35 % мас., краще між 15 і 30 % мас.

При вмісті сухої речовини 5 % мас. або вище, наприклад, при 20 % мас., целюлоза, що міститься в біомасі буде мати в'язкість вище 1000 сР, наприклад 2000 сР.

Відповідно до іншого кращого варіанту перший фермент або перша композиція ферментів додається на етапі скраплення для розрідження щонайменше частини твердих часток, що присутні у біомасі з метою зменшення коефіцієнту в'язкості, на етапі скраплення, до щонайменше 2, щонайменше 4, щонайменше 6, щонайменше 10, щонайменше 15 або, принаймні 20. У цілому коефіцієнт в'язкості має бути меншим 50-ти. Під зменшенням коефіцієнту в'язкості мається на увазі співвідношення між в'язкістю біомаси до етапу скраплення і в'язкістю біомаси, після етапу скраплення (сР / сР).

Для того щоб одержати на етапі скраплення високий вміст твердої речовини й низьку в'язкість, на початковій фазі в реактор можна помістити воду й целюлозу, що міститься в біомасі для скраплення (і перший фермент або ферментну композицію) у кількості, за якої в'язкість буде нижчою за 1000 сР, бажано нижче 800 сР, краще нижче 600 сР. Після цього, в'язкість знижується через додавання ферменту, може бути додано більше біомаси целюлози, і, таким чином, вміст сухої речовини на стадії скраплення збільшиться. Цей початковий етап може здійснюватись доти, доки не буде досягнуто в реакторі скраплення бажаного вмісту сухої речовини. Потім етап скраплення може бути продовжений з підживленням в напівбезперервному або безперервному режимі.

Іншим способом запуску є процедура, під час якої на етапі скраплення целюлоза, що міститься в біомасі має початкову в'язкість вище 500 сР. У цій процедурі тільки після додавання першого ферменту або першої ферментної композиції в'язкість знижується до 1000 сР, бажано нижче 800 сР, і краще нижче 600 сР, а сам етап скраплення відбувається з підживленням, в напівбезперервному або безперервному режимі. У цій процедурі, більша частина першого ферменту або першої ферментної композиції додається спочатку (у розрахунку на кількість сухої речовини біомаси, що містить целюлозу) на початковій стадії, а решта потім підживленням у напівбезперервному або безперервному режимі.

Перший фермент або перша ферментна композиція, яка додається на стадії скраплення відрізняється від другої ферментної композиції, яка застосовується на стадії оцукрювання.

Перший фермент або перша ферментна композиція включає ендоглюканазу.

Перший фермент або перша ферментна композиція містить більше ендоглюканази чим друга ферментна композиція (вираженої в % мас. білку).

В одному з варіантів втілення даного винаходу етап скраплення здійснюється за температури 50 °C або вище, 55 °C або вище, 60 °C або вище, 65 °C або вище, або 70 °C або вище, бажано етап скраплення здійснюють за температури в діапазоні від 65 °C і 110 °C, краще між 65 °C і 90 °C, і іще краще між 65 °C і 80 °C і найкраще між 70 °C і 80 °C. Висока температура впродовж скраплення має багато переваг, серед яких: підтримання оптимальної температури для роботи ферментної композиції, зниження ризику (бактеріального) забруднення, вища активність ферменту, зниження в'язкості після стадії скраплення, швидше зниження в'язкості під час стадії скраплення, необхідна менша кількість охолодженої води, для охолодження використовується вода з більш високою температурою, більша кількість ферментів викорисовуються повторно і це використання є простішим (усі переваги в порівнянні із ситуацією, де на етапі скраплення використовується нижча температура).

В наступному варіанті втілення даного винаходу, кількість першого ферменту або ферментів першої композиції, які додаються (тут, також називається дозою ферменту або ферментним навантаженням) є низькою. В одному з варіантів втілення кількість доданого ферменту на стадії скраплення 6 мг білку/г ваги сухої речовини, або нижче 5 мг білку/г сухої речовини, або нижче 4 мг білку/г сухої речовини, або нижче 3 мг білку/г сухої речовини, або нижче 2 мг білку/г сухої речовини, або нижче 1 мг білку/г сухої речовини, або нижче (виражена, як білок в мг/г сухої

речовини). В іншому варіанті втілення кількість ферменту становить 0,5 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче 0,4 мг ферментної композиції/г ваги сухої речовини, або нижче 0,3 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче 0,25 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче 0,20 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче 0,18 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче 0,15 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче 0,10 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче (виражена, як загальна кількість ферментів целюлази, у мг/г сухої речовини).

В іншому варіанті втілення даного винаходу, розрідження триває 10 годин або менше, 5 годин або менше, 3 години або менше, 2 години або менше. В іншому варіанті втілення, розрідження триває від 1 хвилини до 10 годин і, від 3 хвилин до 5 годин або від 5 хвилин до 3 год. Завдяки стабільності ферментної композиції або ферменту, ферментна композиція, або фермент залишаються активними навіть в наступному етапі (оцукрювання).

Під час скраплення рівень pH може бути обраний фахівцем у даній галузі. В іншому варіанті втілення даного винаходу, рівень pH впродовж скраплення може бути від 3,0 до 6,4. Згідно з винаходом, щоб отримати широкий діапазон pH, до 2 одиниць pH, до 3 одиниць pH, до 5 одиниць pH, можна підібрати відповідні стабільні ферменти. Оптимальне значення pH має лежати в межах від 2.0 до 8.0, 3.0-8.0, 3.5-7.0, 3.5-5.0, 3.5-6.0, 3.5-4.5, 4.0-4.5 або в межах 4,2.

Важливо відзначити, що згідно з винаходом спосіб може бути здійснений з використанням великої кількості сухої речовини (лігноцелюлозного матеріалу) на стадії скраплення. Таким чином, винахід може бути реалізованим зі вмістом сухої речовини 5 % мас. або більше, 8 % мас. або більше, 10 % мас. або більше, 11 % мас. або більше, 12 % мас. або більше, 13 % мас. або більше, 14 % мас. або більше, 15 % мас. або більше, 20 % мас. або більше, 25 % мас. або більше, 30 % мас. або більше, 35 % мас. або більше, 40 % мас. або більше, але краще менше 42 % мас. У іншому варіанті втілення, вміст сухої речовини на стадії скраплення дорівнює 14 % мас., 15 % мас., 16 % мас., 17 % мас., 18 % мас., 19 % мас., 20 % мас., 21 % мас., 22 % мас., 23 % мас., 24 % мас., 25 % мас., 26 % мас., 27 % мас., 28 % мас., 29 % мас., 30 % мас., 31 % мас., 32 % мас., 33 % мас. або більше, або 14-33 мас %.

Бажано, щоб реактор скраплення мав об'єм 1 м³ або більше, бажано більше 10 м³ і найкраще від 50 м³ або більше. Загалом реактор скраплення буде меншим, чим 3000 м³ або 5000 м³.

Оцукрювання

Згідно з винаходом спосіб включає етап ферментативного оцукрювання. Ферментативний гідроліз включає, але не виключно, гідроліз з метою одержання цукру зі скрапленої сировини. На цьому етапі, після скраплення, за необхідності попередньо оброблену і за необхідності попередньо промиту лігноцелюлозну сировину піддають впливу другої ферментної композиції.

Залежно від лігноцелюлозного матеріалу, стадії попередньої обробки й скраплення, різні умови реакції, наприклад температура, доза ферменту, якщо він присутній, час реакції гідролізу й концентрація сухої речовини, можуть бути адаптовані фахівцем у даній галузі за для досягнення бажаної конверсії цукру лігноцелюлози. Деякі вказівки наведені нижче.

Другий ферментну композицію додають на стадії оцукрювання додають з метою одержання олігомерних і/або мономерних цукрів; де друга композиція містить фермент целюлази. Краще щоб друга композиція містила, щонайменше, дві різні целобіогідролази й необов'язково бета-глюкозидази й / або GH61.

В одному з варіантів втілення даного винаходу етап оцукрювання здійснюється за температури 50 °C або вище, 55 °C або вище, 60 °C або вище, 65 °C або вище, 70 °C або вище. Підтримання високої температури під час процесу гідролізу має багато переваг, серед яких: підтримання оптимальної температури для роботи ферментної композиції, зниження ризику (бактеріального) забруднення, вища активність ферменту, зниження в'язкості після стадії скраплення, швидше зниження в'язкості під час стадії скраплення, необхідна менша кількість охолодженої води, для охолодження використовується вода з більш високою температурою, більша кількість ферментів викорисовуються повторно і це використання є простішим.

В іншому варіанті втілення даного винаходу, кількість другої композиції ферментів, яка додається за необхідності (тут, також може називатись доза ферменту або ферментне навантаження) є низькою. В одному з варіантів втілення кількість ферменту, який додається на етапі оцукрювання дорівнює 6 мг білку/г ваги сухої речовини, або нижче, 5 мг білку/г сухої речовини або нижче, 4 мг білку/г сухої речовини або нижче, 3 мг білку/г сухої речовини або нижче, 2 мг білку/г сухої речовини або нижче, або 1 мг білку/г сухої речовини або нижче (виражена, як білок в мг/г сухої речовини). В іншому варіанті втілення кількість ферменту становить 0,5 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче, 0,4 мг ферментної композиції/г ваги сухої речовини, або нижче, 0,3 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче, 0,25 мг

ферменту/г ваги сухої речовини або нижче, 0,20 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче, 0,18 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче, 0,15 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче, або 0,10 мг ферменту/г ваги сухої речовини, або нижче (виражена, як загальна кількість ферментів целюлази у мг/г сухої речовини). Дози ферменту можуть бути низькими, оскільки

через активність і стабільності ферментів, можна підвищити швидкість реакції оцукрювання. В одному з варіантів втілення даного винаходу, час реакції оцукрювання на стадії оцукрювання становить 40 годин або більше, 50 годин або більше, 60 годин або більше, 70 годин або більше, 80 годин або більше, 90 годин або більше, 100 годин або більше, 120 годин або більше, 130 годин або більше. В іншому варіанті втілення, час реакції гідролізу становить 40-130 годин, 50-120 годин, 60-120 годин, 60-110 годин, 60-100 годин, 70-100 годин, 70-90 годин або 70-80 годин. Через стабільність ферментної композиції стає можливим довший час реакції гідролізу з відповідним збільшенням кількості отриманого цукру.

Під час гідролізу на стадії оцукрювання рівень pH може бути обраний фахівцем у даній галузі. В іншому варіанті втілення даного винаходу, рівень pH під час гідролізу може бути від 3,0 до 6,4. Згідно з винаходом стабільні ферменти можуть мати широкий діапазон pH: до 2 одиниць pH, до 3 одиниць pH і до 5 одиниць pH. Оптимальним значення pH є в межах pH від 2.0 до 8.0, 3.0-8.0, 3.5-7.0, 3.5-5.0, 3.5-6.0 3.5-4.5, 4.0-4.5 або близьким 4.2.

В іншому варіанті втілення даного винаходу етап оцукрювання здійснюється доти доки не вивільниться 70 % або більше, 80 % або більше, 85 % або більше, 90 % або більше, 92 % або більше, 95 % або більше доступного цукру лігноцелюлозного матеріалу.

Процес винаходу може бути краще реалізованим за допомогою використання великої кількості сухої речовини (лігноцелюлозного матеріалу) на стадії оцукрювання. Таким чином, винахід може бути реалізованим зі вмістом сухої речовини 5 % мас. або більше, 8 % мас. або більше, 10 % мас. або більше, 11 % мас. або більше, 12 % мас. або більше, 13 % мас. або більше, 14 % мас. або більше, 15 % мас. або більше, 20 % мас. або більше, 25 % мас. або більше, 30 % мас. або більше, 35 % мас. або більше, 40 % мас. або більше, але бажано менше 42 % мас. У іншому варіанті втілення, вміст сухої речовини на стадії оцукрювання становить 14 % мас., 15 % мас., 16 % мас., 17 % мас., 18 % мас., 19 % мас., 20 % мас., 21 % мас., 22 % мас., 23 % мас., 24 % мас., 25 % мас., 26 % мас., 27 % мас., 28 % мас., 29 % мас., 30 % мас., 31 % мас., 32 % мас., 33 % мас. або більше, або 14-33 мас %.

Бажано, щоб реактор оцукрювання мав об'єм 1 м³ або більше, краще більше 10 м³ і найкраще від 50 м³ і більше. Загалом реактор оцукрювання буде меншим за 3000 м³ або 5000 м³.

Використання термостійких ферментів за оптимальних температурних умов

В одному з варіантів втілення даний винахід стосується використання термостійких ферментів, таких як целюлолітичний фермент *Talaromyces* у процесі відділеного скраплення й оцукрювання (SLS) з отриманням редукуючих цукрів з попередньо обробленої лігноцелюлозної сировини в, але не виключно, виробництві етанолу. Целюлолітичні ферменти *Talaromyces* нанесені на попередню оброблену лігноцелюлозну сировину демонструють максимальні темпи перетворення за температури в діапазоні 50-70 °C. Фермент залишається активним у цих умовах протягом 14 днів і довше не припиняючи свою активність повністю.

При використанні оптимальних температурних умов, з вихідної сировини може бути одержана максимальна кількість цукрів, (загальний гідроліз) у найкоротший час гідролізу. Таким чином, перетворення 100 % целюлози в глюкозу досягається менше ніж за 5 днів у процесі SLS з дозою ферменту 0,175 мЛ (6 мг білка)/г сухої речовини сировини. За SSF умов і температури 33° C повне перетворення целюлози на лігноцелюлозну сировину буде тривати близько 168 годин і при цьому дані мезофільні умови визначають час, необхідний для процесу максимального виробництва етанолу із сировини.

У випадку термостійких таких целюлолітичних ферментів, як отримані з *Talaromyces*, що використовуються в процесі SSF з термофільних мікроорганізмів, які продукують етанол, час ферментизації етанолу буде коротшим, оскільки целюлолітичні ферменти *Talaromyces* швидше редукують цукри за більш високих температур, ніж за помірних температур.

У SSF процесі, концентрація продукту (г/л) залежить від кількості продукрованої глюкози, яка є невидимою, оскільки під час SSF цукри перетворюються в продукт, проте концентрації продукту можуть бути підраховані шляхом множення загальної концентрації глюкози на теоретичний максимальний вихід.

Rasamsonia це новий рід, що поєднує термостійкі і термофільні *Talaromyces* і види *Geosmithia* (J.Houbraken і інші *vida supra*). На основі фенотипових, фізіологічних та молекулярних даних, Houbraken та інші запропонували віднести види *T. emersonii*, *T. byssochlamydoides*, *T. eburneus*, *G. argillacea* і *G. cylindrospora* до нового роду *Rasamsonia*, тому

назви *Talaromyces emersonii*, *Penicillium geosmithia emersonii* і *Rasamsonia emersonii* використовуються тут як взаємозамінні.

В одному з варіантів втілення даного винаходу, друга композиція містить фермент целюлазу, краще щонайменше 2 целюлази, ще краще дві різні целобіогідролази й не обов'язково GH61. Бажано, щонайменше, один, краще, щонайменше, два, ще краще щонайменше три із зазначених щонайменше трьох різних ферментів термостабільні.

"Термостабільний" фермент означає, що оптимальна температура для ферменту становить 60 °C або вище, наприклад 70 °C або вище, 75 °C або вище, 80 °C або вище, до 85 °C або вище. Фахівець може обрати придатні полінуклеотиди, використовуючи загальновідомі знання. Вони можуть, наприклад, бути виділені з термофільних мікроорганізмів, або можуть бути розроблені в даній галузі техніки й штучно синтезовані. В одному з варіантів втілення полінуклеотиди можуть бути виділені з термофільних або термостійких нитчатих грибів або виділені з не термофільних або не термостійких грибів, але що можуть бути такими.

У даному документі, целюлаза є будь-яким поліпептидом, який здатний руйнувати або модифікувати целюлозу. Поліпептид, який здатний руйнувати целюлозу є поліпептидом, який здатний каталізувати процес розщеплення целюлози на ланки меншого розміру, або частково, наприклад, на целодекстрини, або повністю на мономери глюкози. Застосування целюлази відповідно до винаходу може призвести, при контакті із целюлозою, до змішаної популяції целодекстринів і мономерів глюкози. Така деградація, як правило, буде проходити за допомогою реакції гідролізу.

Білки GH61 (родини 61 глікозидгідролази або які іноді називають EGIV) є киснезалежними полісахаридмонооксигеназами (PMO) згідно з сучасними даними літератури. Часто в літературі вказують, що дані білки підсилюють дію целюлаз у відношенні лігноцелюлозних субстратів. GH61 спочатку класифікували як ендоглюканазу на підставі вимірювання дуже слабкої ендо-1,4-β-D-глюканазної активності в одного із членів родини. Термін "GH61", як він застосований у даному документі, слід розуміти як родину ферментів, які мають загальні консервативні ділянки послідовності й фолдингу, щоб бути класифікованими до родини 61 згідно із загальновизнаною системою класифікації CAZY GH (<http://www.cazy.org/rh61.html>). Родина глікозидгідролази 61 є членом родини глікозидгідролаз EC 3.2.1. У даному документі GH61 застосовують як складову частину целюлази.

У даному документі, геміцелюлаза є будь-яким поліпептидом, який здатний руйнувати або модифікувати геміцелюлозу. Інакше кажучи, геміцелюлаза може бути здатна руйнувати або модифікувати одне або більше із наступного: ксилан, глюкуронооксилан, арабінооксилан, глюкоманан й ксилоглюкан. Поліпептид, здатний руйнувати геміцелюлозу, є поліпептидом, який здатний каталізувати процес розщеплення геміцелюлози на полісахариди меншого розміру, або частково, наприклад, на олігосахариди, або повністю на мономери цукрів, наприклад, на мономери цукрів, що представляють собою гексозу або пентозу. Геміцелюлаза відповідно до винаходу може приводити до змішаної популяції олігосахаридів і мономерів цукрів при контакті з геміцелюлозою. Така деградація, як правило, буде відбуватися в ході реакції гідролізу.

У даному документі, пектиназа є будь-яким поліпептидом, який здатний руйнувати або модифікувати пектин. Поліпептид, який здатний руйнувати пектин є поліпептидом, який здатний каталізувати процес розщеплення пектину на ланки меншого розміру, або частково, наприклад, на олігосахариди, або повністю на мономери цукрів. Пектиназа відповідно до винаходу може приводити до змішаної популяції олігосахаридів і мономерів цукрів при контакті з пектиназою. Така деградація, як правило, буде відбуватися в ході реакції гідролізу.

У даному документі, целобіогідролаза (EC 3.2.1.91) є будь-яким поліпептидом, який здатний каталізувати гідроліз 1,4-β-D-глюкозидних зв'язків у целюлозі або целотетраозі, вивільняючи целобіозу з кінців ланцюгів. Даний фермент також може бути віднесено до целюлази, 1,4-β-целобіозидази, 1,4-β-целобіогідролази, 1,4-β-D-глюканцелобіогідролази, авіцелази, екзо-1,4-β-D-глюканази, екзоцелобіогідролази або екзоглюканази.

У даному документі, ендо-β-1,4-глюканаза (EC 3.2.1.4) є будь-яким поліпептидом, який здатний каталізувати ендогідроліз 1,4-β-D-глюкозидних зв'язків у целюлозі, лишенині або β-D-глюканах злакових. Такий поліпептид також може бути здатний гідролізувати 1,4-зв'язки в β-D-глюканах, що також містять 1,3-зв'язки. Даний фермент також може бути віднесений до целюлази, авіцелази, β-1,4-ендоглюкангідролази, β-1,4-глюканази, карбоксиметилцелюлази, целодекстринази, ендо-1,4-β-D-глюканази, ендо-1,4-β-D-глюканогідролази, ендо-1,4-β-глюканази або ендоглюканази.

У даному документі, β-глюкозидаза (EC 3.2.1.21) є будь-яким поліпептидом, який здатний каталізувати гідроліз термінальних нередукуючих залишків, β-D-глюкози з вивільненням β-D-глюкози. Такий поліпептид може мати широку специфічність у відношенні β-D-глюкозидів і також

може гідролізувати одне або декілька з наступного: β -D-галактозид, α -L-арабінозид, β -D-ксилозид або β -D-фукозид. Даний фермент також може бути віднесений до амігдалази, β -D-глюкозидглюкогідролази, целобіази або гентобіази.

У даному документі β -(1,3)(1,4)-глюканаза (ЕС 3.2.1.73) є будь-яким поліпептидом, здатним каталізувати гідроліз 1,4- β -D-глюкозидних зв'язків в β -D-глюканах, що містять 1,3- і 1,4-зв'язки. Такий поліпептид може діяти на ліхенін і β -D-глюкани злакових, але не на β -D-глюкани, що містять тільки 1,3- або 1,4-зв'язки. Даний фермент також може бути віднесено до ліхенінази, 1,3-1,4-глюканогідролази, β -глюканази, енд- β -1,3-1,4 глюканази, ліхенази або β -глюканази зі змішаними зв'язками. ЕС 3.2.1.6, яка описана як енд-1,3(4)-бета-глюканаза, є альтернативною цьому типу ферменту. Даний тип ферменту гідролізує 1,3- або 1,4-зв'язки в бета-D-глюкані, якщо залишок глюкози редукуюча група якого бере участь в утворенні гідролізованого зв'язку, самозаміщений на C-3. Альтернативні назви включають енд-1,3-бета-глюканазу, ламінариназу, 1,3-(1,3;1,4)- β -D-глюкан-3-(4)-глюканогідролазу; субстрати включають ламінарин, ліхенін і бета-D-глюкани злакових.

Згідно з винаходом у способі може бути використана будь-яка геміцелюлаза, наприклад, ендоксираназа, β -ксилозидаза, α -L-арабінофуранозидаза, α -D-глюкуронідаза, ацетилксиланестераза, ферулоїлестераза, кумароїлестераза, α -галактозидаза, β -галактозидаза, β -мананаза або β -манозидаза.

У даному документі, ендоксираназа (ЕС 3.2.1.8) є будь-яким поліпептидом, який здатний каталізувати ендогідроліз 1,4- β -D-ксилозидні зв'язки в ксиланах. Даний фермент також може бути віднесено до енд-1,4- β -ксиланази або 1,4- β -D-ксиланксиланогідролази. Альтернативною є глюкуроноарабіноксилан-ендоксираназа ЕС 3.2.1.136, фермент, який здатний гідролізувати 1,4-ксилозидні зв'язки в глюкуроноарабіноксиланах.

У даному документі, β -ксилозидаза (ЕС 3.2.1.37) є будь-яким поліпептидом, здатним каталізувати гідроліз 1,4- β -D-ксиланів, послідовно видаляючи залишки D-ксилози з нередукуючих кінців. Такі ферменти також можуть гідролізувати ксилобіозу. Даний фермент також може бути віднесено до ксилан-1,4- β -ксилозидази, 1,4- β -D-ксилан-ксилогідролази, екзо-1,4- β -ксилозидази або ксилобіази.

У даному документі, α -L-арабінофуранозидаза (ЕС 3.2.1.55) є будь-яким поліпептидом, який здатний діяти на α -L-арабінофуранозиди, α -L-арабініни, які містять (1,2) і/або (1,3)- і/або (1,5)-зв'язки, арабіноксилани й арабіногалактани. Даний фермент також може бути віднесений до α -N-арабінофуранозидази, арабінофуранозидази або арабінозидази.

У даному документі, α -D-глюкуронідаза (ЕС 3.2.1.139) є будь-яким поліпептидом, здатним каталізувати реакцію, що протікає згідно з наступним рівнянням: альфа-D-глюкуронозид + $\text{H}(2)\text{O}$ = спирт + D-глюкуронат. Даний фермент також може бути віднесений до альфа-глюкуронідази або альфа-глюкозидуранази. Дані ферменти також можуть гідролізувати 4-О-метильовану глюкуронову кислоту, яка також може бути присутньою як замісник у ксиланах. Альтернативною є ЕС 3.2.1.131: ксилан-альфа-1,2-глюкуронозидаза, яка каталізує гідроліз альфа-1,2-(4-О-метил)глюкуронозильних зв'язків.

У даному документі, ацетилксиланестераза (ЕС 3.1.1.72) є будь-яким поліпептидом, який здатний каталізувати деацетилювання ксиланів і ксилоолігосахаридів. Такий поліпептид може каталізувати гідроліз ацетильних груп полімерного ксилану, ацетилюваної ксилози, ацетилюваної глюкози, альфа-нафтил-ацетату або р-нітрофенілацетату, але, як правило, не триацетилгліцерину. Такий поліпептид, як правило, не діє на ацетилюваний манан або пектин.

У даному документі, ферулоїлестераза (ЕС 3.1.1.73) є будь-яким поліпептидом, здатним каталізувати реакцію згідно з наступним рівнянням: ферулоїл-сахарид + $\text{H}(2)\text{O}$ = ферулат + сахарид. Сахарид, наприклад, може бути олігосахаридом або полісахаридом. Фермент може, як правило, каталізувати гідроліз 3-метоксицинамоїльної (ферулоїльної) групи естерифікованого цукру, який звичайно є арабінозою в "природних" субстратах. П-нітрофенолацетат і метилферулат, як правило, представляють собою не досить гарні субстрати. Даний фермент також може бути віднесений до гідролази цинамоїлового ефіру, естерази ферулової кислоти або гідроксицинамоїлестерази. Він також може бути віднесений до допоміжного геміцелюлазного ферменту, оскільки він може допомагати ксиланазам і пектиназам руйнувати геміцелюлозу й пектин клітинної стінки рослин.

У даному документі, кумароїлестераза (ЕС 3.1.1.73) є будь-яким поліпептидом, здатним каталізувати реакцію згідно наступного рівняння: кумароїл-сахарид + $\text{H}(2)\text{O}$ = кумарат + сахарид. Сахарид, наприклад, може бути олігосахаридом або полісахаридом. Даний фермент також може бути віднесений до транс-4-кумароїлестерази, транс-п-кумароїлестерази, п-кумароїлестерази або естерази п-кумарової кислоти. Даний фермент також входить в ЕС 3.1.1.73, тому також може бути віднесений до ферулоїлестерази.

У даному документі, α -галактозидаза (ЕС 3.2.1.22) є будь-яким поліпептидом, здатним каталізувати гідроліз термінальних нередукуючих залишків α -D-галактози в α -D-галактозидах, включаючи галактозу олігосахаридів, галактомананів, галактанів і арабіногалактанів. Такий поліпептид також може бути здатний гідролізувати α -D-фукозиди. Даний фермент також може

5 бути віднесений до мелібіази.

У даному документі, β -галактозидаза (ЕС 3.2.1.23) є будь-яким поліпептидом, здатним каталізувати гідроліз термінальних нередукуючих залишків β -D-галактози в β -D-галактозидах. Такий поліпептид також може бути здатний гідролізувати α -L-арабінозиди. Даний фермент також може бути віднесений до екзо-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-галактанази або лактази.

10 У даному документі, β -мананаза (ЕС 3.2.1.78) є будь-яким поліпептидом, який здатний каталізувати неупорядкований гідроліз 1,4- β -D-манозидних зв'язків у мананах, галактомананах і глюкомананах. Даний фермент також може бути віднесений до манан-ендо-1,4- β -манозидази або ендо-1,4-мананази.

15 У даному документі, β -манозидаза (ЕС 3.2.1.25) є будь-яким поліпептидом, здатним каталізувати гідроліз термінальних нередукуючих залишків β -D-манози в β -D-манозидах. Даний фермент також може бути віднесений до мананаз або маназ.

Ферментна композиція може включати будь-яку пектиназу, наприклад, ендополігалактуроназу, пектинметилестеразу, ендогалактаназу, бета-галактозидазу, пектинацетилестеразу, ендопектиноліазу, пектатліазу, альфа-рамнозидазу, екzogалактуроназу, екзополігалактуронатліазу, рамногалактуронангідролазу, рамногалактуронанліазу, рамногалактуронанацетилестеразу, рамногалактуронангалактуроногідролазу й ксигалактуроназу.

25 У даному документі, ендополігалактуроназа (ЕС 3.2.1.15) є будь-яким поліпептидом, який здатний каталізувати неупорядкований гідроліз 1,4- α -D-галактозидуронових зв'язків у пектаті й інших галактуронанах. Даний фермент також може бути віднесений до полігалактуронази, пектиндеполімерази, пектинази, ендополігалактуронази, пектолази, пектингідролази, пектинполігалактуронази, полі- α -1,4-галактуронідглікангідролази, ендогалактуронази, ендо-D-галактуронази або полі(1,4- α -D-галактуронід)глікангідролази.

30 У даному документі, пектинметилестераза (ЕС 3.1.1.11) є будь-яким ферментом, здатним каталізувати реакцію: пектин + n H₂O = n метанол + пектат. Фермент може бути також відомий як пектинестераза, пектиндеметоксилаза, пектинметоксилаза, пектинметилестераза, пектаза, пектиноестераза або пектинпектилгідролаза.

35 У даному документі, ендогалактаназа (ЕС 3.2.1.89) є будь-яким ферментом, здатним каталізувати ендогідроліз 1,4- β -D-галактозидних зв'язків в арабіногалактанах. Фермент також може бути відомий як арабіногалактанендо-1,4- β -галактозидаза, ендо-1,4- β -галактаназа, галактаназа, арабіногалактаназа або арабіногалактан-4- β -D-галактаногідролаза.

У даному документі, пектинацетилестеразу визначають як будь-який фермент, який має ацетилестеразну активність, яка каталізує деацетилювання ацетильних груп на гідроксильних групах залишків GalUA пектину.

40 У даному документі, ендопектинліаза (ЕС 4.2.2.10) є будь-яким ферментом, здатним каталізувати елімінуюче розщеплення (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-галактуронанметилового ефіру з утворенням олігосахаридів з 4-деокси-6-О-метил- α -D-галакт-4-енуронозидовими групами на їхніх нередукуючих кінцях. Фермент також може бути відомий як пектинліаза, пектин-транс-еліміназа; ендопектинліаза, поліметилгалактуронова транселіміназа, пектинметилтранселіміназа, пектоліаза, PL, PNL або PMGL або (1 $\rightarrow$ 4)-6-О-метил- α -D-галактуронанліаза.

45 В даному документі, пектатліаза (ЕС 4.2.2.2) є будь-яким ферментом, здатним каталізувати елімінуюче розщеплення (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-галактуронана з утворенням олігосахаридів з 4-деокси- α -D-галакт-4-енуронозидовими групами на їхніх нередукуючих кінцях. Фермент також може бути відомий як полігалактуронова транселіміназа, транселіміназа пектинової кислоти, полігалактуронатліаза, ендопектинметилтранселіміназа, пектаттранселіміназа, ендогалактуронаттранселіміназа, ліаза пектинової кислоти, пектинова ліаза, ліаза α -1,4-D-ендополігалактуронової кислоти, PGA-ліаза, PPaза-N, ліаза ендо- α -1,4-полігалактуронової кислоти, ліаза полігалактуронової кислоти, пектин-транселіміназа, транселіміназа полігалактуронової кислоти або (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-галактуронанліаза.

55 У даному документі, альфа-рамнозидаза (ЕС 3.2.1.40) є будь-яким поліпептидом, здатним каталізувати гідроліз термінальних нередукуючих залишків α -L-рамнози в α -L-рамнозидах або альтернативно в рамногалактуронані. Даний фермент також може бути відомий як α -L-рамнозидаза Т, α -L-рамнозидаза N або L-рамнозид-рамногідролаза.

60 У даному документі, екzogалактуроназа (ЕС 3.2.1.82) є будь-яким поліпептидом, здатним гідролізувати пектинову кислоту на нередукуючому кінці вивільняючи дигалактуронат. Фермент

також може бути відомий як екзополі- α -галактуронозидаза, екзополігалактуронозидаза або екзополігалактуронозидаза.

У даному документі, екзогалактуроноза (ЕС 3.2.1.67) є будь-яким поліпептидом, здатним каталізувати реакцію: $(1,4\text{-}\alpha\text{-D-галактуронід})_n + \text{H}_2\text{O} = (1,4\text{-}\alpha\text{-D-галактуронід})_{n-1} + \text{D-галактуронат}$. Фермент також може бути відомий як галактуран-1,4- α -галактуронідаза, екзополігалактуроноза, полі(галактуронат)гідролаза, екзо-D-галактуроноза, екзо-D-галактуронаназа, екзополі-D-галактуроноза або полі(1,4- α -D-галактуронід)галактуроногідролаза.

У даному документі, екзополігалактуронат-ліаза (ЕС 4.2.2.9) є будь-яким поліпептидом, здатним каталізувати елімінуючи розщеплення 4-(4-деокси- α -D-галакт-4-енуронозил)-D-галактуроната на редуруючому кінці пектата, тобто деестерифікованого пектину. Даний фермент може бути відомий як пектат-дисахарид-ліаза, пектат-екзоліаза, транселіміназа екзопектинової кислоти, екзопектат-ліаза, транселіміназа екзополігалактуронової кислоти, PATE, екзо-PATE, екзо-PGL або дисахарид-ліаза редууючого кінця $(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-галактуронана}$.

У даному документі, рамногалактуронан-гідролаза є будь-яким поліпептидом, здатним гідролізувати зв'язок між галактозилуроновою кислотою й рамнопіранозилом у будь-якій ендормі в рамногалактуронанових структурах, які строго чергуються, який складається з дисахариду [(1,2-альфа-L-рамноїл-(1,4)-альфа-галактозилуронової кислоти)].

У даному документі, рамногалактуронан-ліаза є будь-яким поліпептидом, який є будь-яким поліпептидом, який здатний розщеплювати зв'язки $\alpha\text{-L-Rhap-(1} \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA}$ зв'язки ендоспособом у рамногалактуронані за допомогою бета-елімінації.

У даному документі, рамногалактуронан-ацетилестераза є будь-яким поліпептидом, який каталізує деацетилювання основного ланцюга залишків рамнози, які чергуються, й галактуронової кислоти в рамногалактуронані.

У даному документі, рамногалактуронан-галактуроногідролаза є будь-яким поліпептидом, здатним гідролізувати екзоспособом галактуронову кислоту від нередууючого кінця структур рамногалактуронана, які строго чередуються.

У даному документі, ксилогалактуроноза є будь-яким поліпептидом, який діє на ксилогалактуронан ендоспособом за допомогою розщеплення основного ланцюга заміщеної β -ксилозою галактуронової кислоти. Даний фермент також може бути відомий як ксилогалактуронан-гідролаза.

У даному документі, $\alpha\text{-L-арабінофуранозидаза}$ (ЕС 3.2.1.55) є будь-яким поліпептидом, який здатний діяти на $\alpha\text{-L-арабінофуранозиди}$, $\alpha\text{-L-арабінани}$, які містять (1,2) і/або (1,3)- і/або (1,5)-зв'язки, арабіноксилани й арабіногалактани. Даний фермент також може бути віднесений до $\alpha\text{-N-арабінофуранозидази}$, арабінофуранозидази або арабінозидази.

У даному документі, ендорабіназа (ЕС 3.2.1.99) є будь-яким поліпептидом, здатним каталізувати ендогідроліз 1,5- α -арабінофуранозидних зв'язків в 1,5-арабінах. Фермент також може бути відомий як ендорабіназа, арабінан-ендо-1,5- $\alpha\text{-L-арабінозидаза}$, енд-1,5- $\alpha\text{-L-арабіназа}$, енд- $\alpha\text{-1,5-арабаназа}$; ендорабаназа або 1,5- $\alpha\text{-L-арабінан-1,5-}\alpha\text{-L-арабінаногідролаза}$.

Ферментна композиція може містити щонайменше одну целюлазу й за необхідності щонайменше одну геміцелюлазу й за необхідності щонайменше одну пектиназу (одна з яких є поліпептидом відповідно до винаходу). Друга ферментна композиція може включати GH61, целобіогідролазу, ендоглюканазу й/або β -глюкозидазу. Така композиція також може включати одну або декілька геміцелюлаз і/або одну або декілька пектиназ.

Крім того, у композиції винаходу можуть бути присутніми один або декілька (наприклад, два, три, чотири або всі) з перерахованих ферментів: амілаза, протеаза, ліпаза, лігніназа, гексозилтрансфераза, глюкуронідаза або експансин або індукований целюлозою білок або інтегруючий на целюлозі білок або подібний білок може бути використаний у способі за винаходом (вище вони названі допоміжними активностями).

"Протеаза" включає ферменти, які гідролізують пептидні зв'язки (пептидази), а також ферменти, які гідролізують зв'язки між пептидами й іншими складовими, такими як цукри (глікопептидази). Безліч протеаз, які характеризуються відповідно до ЕС 3.4 і які придатні для застосування за винаходом, включені в даний документ шляхом відсилання. Деякі специфічні типи протеаз включають цистеїнові протеази, включаючи пепсин, папаїн і серинові протеази, включаючи хімотрипсини, карбоксипептидази й металоендопептидази.

Термін "ліпаза" включає ферменти, які гідролізують ліпіди, жирні кислоти й ацилгліцериди, включаючи фосфогліцериди, ліпопротеїни, діацилгліцерини й т.п. У рослинах ліпіди використовуються як структурні компоненти для обмеження втрати води й патогенних інфекцій. Ці ліпіди включають воски, отримані з жирних кислот, а також кутин і суберин.

Термін "лігніназа" включає ферменти, які можуть гідролізувати або руйнувати структуру

лігнінових полімерів. Ферменти, які можуть зруйнувати лігнін, включають лігнінпероксидази, марганець-пероксидази, лаккази й феруоїлестерази й інші ферменти, описані в даній галузі техніки, відомі своєю здатністю деполімеризувати або, в іншому випадку, руйнувати лігнінові полімери. Також включають ферменти, здатні гідролізувати зв'язки, утворені між

геміцелюлозними цукрами (особливо, арабінозою) і лігніном. Лігнінази включають, але не обмежуються ними, наступні групи ферментів: лігнінпероксидази (ЕС 1.11.1.14), марганецьпероксидази (ЕС 1.11.1.13), лаккази (ЕС 1.10.3.2) і феруоїлестерази (ЕС 3.1.1.73).

Термін "гексозилтрансфераза" (2,4,1-) включає ферменти, які здатні каталізувати трансферазну реакцію, але які можуть також каталізувати реакцію гідролізу, наприклад,

целюлози й/або продуктів деградації целюлози. β -глюканозилтрансфераза є прикладом гексозилтрансферази, яка може бути застосована за винаходом. Такий фермент може бути здатний каталізувати деградацію (1,3)(1,4)глюкана й/або целюлози й/або продукту деградації целюлози.

Термін "глюкуронідаза" включає ферменти, які каталізують гідроліз глюкуронозида, наприклад, β -глюкуронозида з одержанням спирту. Багато глюкуронідаз були охарактеризовані, і вони можуть підходити для застосування за винаходом, наприклад, β -глюкуронідаза (ЕС 3.2.1.31), гіалуроно-глюкуронідаза (ЕС 3.2.1.36), глюкуронозил-дисульфглюкозамін-глюкуронідаза (3.2.1.56), гліцирризинат- β -глюкуронідаза (3.2.1.128) або α -D-глюкуронідаза (ЕС 3.2.1.139).

Композиція для застосування за винаходом може включати експансин або експансин-подібний білок, такий як своленін (дивися, Salheimo et al., Eur. J. Biochem. 269, 4202-4211, 2002) або своленін-подібний білок.

Експансини залучені в ослаблення структури клітинної стінки в ході росту рослинної клітини. Передбачається, що експансини руйнують водневі зв'язки між целюлозою й іншими полісахаридами клітинної стінки, не володіючи гідролітичною активністю. Таким чином, вони, як вважається, дозволяють розсунути волокна целюлози й розширити клітинну стінку. Своленін, експансин-подібний білок містить домен N-кінцевого вуглець-з'єднуючого модуля родини 1 (CBD) і C-кінцевий експансин-подібний домен. Для цілей даного винаходу, експансин-подібний білок або своленін-подібний білок може включати один або обидва таких домена й/або може руйнувати структуру клітинних стінок (наприклад, порушуючи структуру целюлози), необов'язково, без утворення детектованих кількостей редуруючих цукрів.

Згідно з винаходом у способі можуть бути використані ферменти з кожного з класів згаданих вище, кілька з одного класу ферментів, або будь-яка комбінація цих ферментів або допоміжних протеїнів (тобто ті білки, які були згадані в цьому документі, які не мають ферментативної активності самі по собі, але, тим не менш допомагають у лігноцелюлозній деградації).

Згідно з винаходом у способі можуть бути використані ферменти, отримані (1) від комерційних постачальників; (2) з ферментів, експресованих клонуваними генами; (3) зі складного бульйону (такого, як бульйон, одержуваний у результаті росту мікробного штаму в середовищі, у якому штами секретують білки й ферменти в середовища); (4) із клітинних лізатів штамів, що ростуть як в (3); і/або (5) з рослинного матеріалу, експресуючого ферменти. Різні ферменти в композиції винаходу можуть бути отримані з різних джерел.

Ферменти можуть бути отримані екзогенно в мікроорганізмах, дріжджах, грибах, бактеріях або рослинах, потім виділені й додані, наприклад, до лігноцелюлозної вихідної сировини. Альтернативно, ферменти продукують, але не виділяють, і неочищений ферментаційний бульйон із клітинною масою або рослинний матеріал (такий як кукурудзяна солома або пшенична солома), і їм подібні, можуть бути додані, наприклад, у вихідну сировину. Альтернативно, неочищена клітинна маса або середовище продукування ферменту або рослинний матеріал можуть бути оброблені для запобігання подальшого мікробного росту (наприклад, нагріванням або додаванням антимікробних засобів), а потім додані, наприклад, у вихідну сировину. Дані неочищені суміші ферментів можуть включати організм, продукуючий фермент. Альтернативно, фермент може бути отриманий при ферментації, у якій використовують (попередньо оброблену) вихідну сировину (таку як кукурудзяна солома або пшенична солома) для забезпечення харчування організму, який продукує фермент(ферменти). Таким чином, рослини, які продукують ферменти, можуть самі служити в якості лігноцелюлозної вихідної сировини й можуть бути додані в лігноцелюлозну вихідну сировину.

Ферментація

Згідно з даним винаходом спосіб може додатково включати стадію ферментації. В одному з варіантів втілення даний винахід за необхідності включає процес ферментації, в якому для ферментації джерела вуглецю, яке містить цукор(цукри), наприклад, глюкозу, L-арабінозу й/або ксиліозу, застосовують мікроорганізми. Джерело вуглецю може включати будь-який вуглецевий

оліго- або полімер, що включає ланки L-арабінози, ксилози або глюкози, такий, наприклад, як лігноцелюлоза, ксилани, целюлоза, крохмаль, арабінан і їм подібні. Для вивільнення ланок ксилози або глюкози з таких вуглеводів, що відповідають карбогідразі (такі як ксиланази, глюканази, амілази і їм подібні) можуть бути додані до середовища ферментації або можуть
 5 бути отримані за допомогою модифікованої клітини-хазяїна. В останньому випадку модифікована клітина-хазяїн може бути створена методами генетичної інженерії для продукування й екскреції такої карбогідрази. Додаткова перевага застосування оліго- або полімерних джерел глюкози полягає в тому, що воно дозволяє підтримувати низькі(знижені) концентрації вільної глюкози в ході ферментації, наприклад, застосовуючи швидкість-лімітуючі
 10 кількості карбогідраз. Це, у свою чергу, буде перешкоджати пригніченню систем, необхідних для метаболізму й транспорту такого цукру як ксилоза, який не є глюкозою. У кращому способі модифікована клітина-хазяїн ферментує як L-арабінозу (необов'язково, ксилозу), так і глюкозу, переважно, одночасно, у такому випадку переважно застосовують модифіковану клітину-хазяїна, яка нечутлива до глюкозної репресії для запобігання діауксичного росту. При
 15 додаванні до джерела L-арабінози, необов'язково, ксилози (і глюкози) у якості джерела вуглецю, середовище ферментації додатково буде включати відповідний інгредієнт, необхідний для росту модифікованої клітини-хазяїна. Композиції середовища ферментації для росту мікроорганізмів, таких як дріжджі або нитчасті гриби, добре відомі в даній галузі техніки.

Тривалість ферментації може бути менша, ніж при традиційній ферментації за тих же умов,
 20 за яких частина ферментативного гідролізу як і раніше повинна взяти участь у ході ферментації. В одному із втілень, тривалість ферментації дорівнює 100 годинам або менше, 90 годинам або менше, 80 годинам або менше, 70 годинам або менше, або 60 годинам або менше, для композиції цукрів з 50 г/л глюкози й відповідних інших цукрів з лігноцелюлозної вихідної сировини (наприклад, 50 г/л ксилози, 35 г/л L-арабінози й 10 г/л галактози). Для більше
 25 розбавлених композицій цукрів тривалість ферментації може бути відповідно знижена.

Спосіб ферментації може бути аеробним або анаеробним способом ферментації. Анаеробний спосіб ферментації в даному документі визначають як цикл способу ферментації за відсутності кисню або як цикл способу ферментації, у якому кисень у значній мірі не споживається, переважно, споживається менше ніж 5, 2,5 або 1 ммоль/л/годину, більше
 30 переважно, 0 ммоль/л/годину (тобто споживання кисню не детектується), і в якому органічні молекули служать як донорами електронів, так і електронних акцепторів. За відсутності кисню NADH, вироблений у процесі гліколізу й при утворенні біомаси, не може бути окиснений шляхом окисного фосфорилування. Для розв'язання цієї проблеми багато мікроорганізмів використовують піруват або одне з його похідних як акцептор електрона й водню, тим самим
 35 регенеруючи NAD⁺. Таким чином, у кращому анаеробному способі ферментації піруват застосовують як акцептор електрона (і водню), і він відновлюється до таких продуктів ферментації, як етанол, молочна кислота, гідрокси-пропіонова кислота, акрилова кислота, оцтова кислота, бурштинова кислота, лимонна кислота, яблучна кислота, фумарова кислота, амінокислота, 1,3-пропан-діол, етилен, гліцерил, бутанол, метан або біогаз, β-лактамі
 40 антибіотики й цефалоспорин. У кращому втіленні, спосіб ферментації є анаеробним способом. Анаеробний спосіб кращий, оскільки він дешевше аеробних способів: для нього потрібно менш спеціалізоване обладнання. Крім того, очікується, що анаеробні способи дадуть більше високий вихід продукту в порівнянні з аеробними способами. За аеробних умов, як правило, вихід біомаси вище, ніж за анаеробних умов. Внаслідок цього, як правило, за аеробних умов,
 45 очікуваний вихід продукту нижче, ніж за анаеробних умов.

В іншому втіленні, спосіб ферментації є способом ферментації за умов лімітованих за киснем. Краще, спосіб ферментації є аеробним і способом ферментації за лімітованих за киснем умов. Лімітований за киснем спосіб ферментації є таким способом, у якому споживання
 50 кисню лімітується перенесенням кисню з газоподібної фази в рідину. Ступінь обмеження за киснем визначають за кількістю й композицією потоку вхідного газу, а також за фактичними характеристиками зі змішування/перенесення мас застосованого ферментаційного встаткування. Переважно, у способі в умовах лімітування за киснем, швидкість споживання кисню дорівнює, щонайменше, 5,5, більше переважно, щонайменше, 6, і ще більше переважно, щонайменше, 7 ммоль/л/годину.

Спосіб ферментації бажано здійснюють за температури, оптимальної для модифікованої клітини. Таким чином, для більшеості клітин дріжджів або грибів, спосіб ферментації здійснюють за температури менше ніж 42°C, переважно, менше ніж 38°C. Для клітин-хазяїв, що представляють собою дріжджові клітини або клітини нитчастих грибів, спосіб ферментації
 60 переважно здійснюють за температури нижче, ніж 35, 33, 30 або 28°C, і за температури вище, ніж 20, 22 або 25°C.

У втіленні винаходу, ферментацію проводять із мікроорганізмом, який здатний ферментувати, щонайменше, один С5-цукор. У втіленні, спосіб є способом продукування етанолу, де спосіб включає стадію d, яка передбачає ферментування середовища, яке містить цукор(цукри) з мікроорганізмом, який здатний ферментувати, щонайменше, один С5-цукор, у результаті чого клітина-хазяїн здатна ферментувати глюкозу, L-арабінозу й ксилозу до етанолу. У втіленні цього способу, мікроорганізмом який здатний ферментувати, щонайменше, один С5-цукор, є дріжджі. У втіленні, дріжджі належать до роду *Saccharomyces*, переважно, до виду *Saccharomyces cerevisiae*.

В одному з варіантів втілення, процес ферментації для виробництва етанолу є анаеробним. Термін "анаеробний" уже був визначений вище в даному документі. В іншому кращому втіленні, спосіб ферментації для одержання етанолу є аеробним способом ферментації. В іншому кращому втіленні, спосіб ферментації для одержання етанолу є способом ферментації за умов лімітованих за киснем, ще краще, способом ферментації, за аеробних умов і за умов лімітованих за киснем. Лімітовані за киснем умови вже були визначені вище в даному документі.

У такому способі, об'ємна продуктивність етанолу переважно дорівнює, щонайменше, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 5,0 або 10,0 г етанолу на літр на годину. Вихід за етанолом на L-арабінозі й, необов'язково, на ксилозі й/або глюкозі, у способі переважно дорівнює, щонайменше, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 95 або 98 %. Вихід за етанолом в даному документі визначають як відсоток від теоретичного максимального виходу, який для глюкози й L-арабінози й, необов'язково, ксилози рівний 0,51 г етанолу на г глюкози або ксилози.

В одному з варіанті втілення, не обов'язковий спосіб ферментації, який веде до продукції етанолу, має кілька переваг у порівнянні з відомими способами ферментації, застосовуваними для одержання етанолу:

- можливі анаеробні способи;
- також можливі умови лімітовані за киснем;
- можуть бути отримані підвищені виходи за етанолом й підвищені обсяги виробництва етанолу;
- застосований штам може бути здатний використовувати L-арабінозу й, необов'язково, ксилозу.

Альтернативно описаним вище способам ферментації, можуть бути застосовані, щонайменше, дві різні клітини, це означає, що даний спосіб є способом спільної ферментації. Усі кращі втілення способів ферментації, такі як описані вище, також є кращими втіленнями даного способу спільної ферментації: ідентичний продукт ферментації, ідентичне джерело L-арабінози й джерело ксилози, умови ферментації (аеробні або анаеробні умови, лімітовані за киснем умови, температура, за якої спосіб здійснюють, ефективність виробництва етанолу, вихід етанолу).

Спосіб ферментації може бути здійснений без яких-небудь вимог до доведення рН у ході способу. Інакше кажучи, спосіб є способом, який може бути здійснений без додавання якої-небудь кислоти(кислот) або основи(основ). Однак це вірно, за винятком стадії попередньої обробки, на якій кислота може бути додана. Справа в тому, що композиція винаходу здатна діяти за низьких рН і, таким чином, немає необхідності корегувати рН попередньо обробленої кислотою вихідної сировини для того, щоб могло протікати оцукрювання. Відповідно, спосіб винаходу може бути безвідходним способом із застосуванням тільки органічних продуктів без необхідності введення неорганічних хімічних сполук.

Загальний час реакції

Відповідно до винаходу, загальний час реакції (тобто сукупний час реакції зрідження і стадії гідролізу і, необов'язкової, стадії ферментації) може бути знижений. В одному із втілень, загальний час реакції дорівнює 150 годинам або менше, 140 годинам або менше, 130 або менше, 120 годинам або менше, 110 годинам або менше, 100 годинам або менше, 90 годинам або менше, 80 годинам або менше, 75 годинам або менше, або приблизно 72 годинам при 90 %-ному виході глюкози. Відповідно, зниження загального часу може бути досягнуте при зниженні виходу глюкози. Незалежно від методу, яким спосіб переводять в режим SLH.

Продукти ферментації

Продукти ферментації, які можуть бути отримані відповідно до винаходу, включають амінокислоти, вітаміни, лікарські препарати, кормові добавки для тварин, хімічні продукти спеціального призначення, хімічна вихідна сировина, пластмаси, розчинники, паливо, таке як метан або біогаз та етанол або інші органічні полімери, молочну кислоту, у тому числі паливний етанол (під терміном "етанол" розуміють як етиловий спирт, так і суміш етилового спирту й води).

Конкретні цінні продукти, які можуть бути отримані способами винаходу, включають, але не

обмежуються цим, різні види біопалива (включаючи етанол і бутанол); молочну кислоту; гідрокси-пропіонову кислоту; акрилову кислоту; оцтову кислоту; 1,3-пропан-діол; етилен; гліцерин; пластмаси; хімічні продукти спеціального призначення; органічну кислоту, включаючи лимонну кислоту, бурштинову кислоту й малеїнову кислоту; розчинник; добавку до кормів для тварин; лікарський препарат, такий як β -лактамний антибіотик або цефалоспорин; вітамін; амінокислоту, таку як лізин, метіонін, триптофан, треонін і аспарагінову кислоту; фермент, такий як протеаза, целюлаза, амілаза, глюканаза, лактаза, ліпаза, ліаза, оксидоредуктаза, трансфераза або ксиланаза; вихідну хімічну сировину; або добавку до кормів для тварин.

Розділення продуктів ферментації

Згідно з винаходом спосіб необов'язково, включає виділення продукту ферментації. Продукт ферментації може бути продуктом, який відділений від ферментаційного бульйону будь-яким відомим способом. Таким чином, для кожного продукту ферментації фахівець буде здатний вибрати належну методику виділення. Наприклад, етанол може бути відділений від дріжджового ферментаційного бульйону шляхом перегонки, наприклад, перегонки традиційним способом з водяною парою/перегонки за зниженого тиску.

Деякі втілення винаходу будуть докладно описані нижче, але вони жодним чином не обмежують обсяг даного винаходу.

Повторне застосування ферментів після гідролізу зі стабільними ферментами

Наприкінці гідролізу, ферментативні активності, як видно, будуть низькими, оскільки мало редукуючих цукрів вивільняється, коли перетворена майже вся целюлоза. Кількість присутньої ензиматичної активності, однак, упаде лише незначно, приблизно, головним чином, через абсорбцію ферментів на субстраті. Застосовуючи поділ твердої речовини й рідини після гідролізу, такий як центрифугування, фільтрація, осадження й т.п., 60 % або більше, наприклад, 70 % ферментативної активності в розчині може бути виділено й повторно застосовано для зрідження або гідролізу нової попередньо обробленої лігноцелюлозної вихідної сировини в ході наступного гідролізу.

Крім того, після поділу твердої речовини й рідини, фермент у розчині може бути відділений від розчину, що містить редукуючі цукри й інші продукти гідролізу, отримані в результаті діяльності ферментів. Даний поділ може бути виконаний, без обмежень, за допомогою (ультра й мікро) фільтрації, центрифугування, осадження, седиментації, з вихідною адсорбцією ферменту на носії будь-якого типу або без неї.

Наприклад, після гідролізу попередньо обробленої вихідної сировини з ферментним навантаженням, рівним 0,175 мл/г сухої речовини вихідної сировини редукуючі цукри вивільняються в кількості 50 % від теоретичного максимуму протягом 20-ти годин, і після такого ж гідролізу 90 % від теоретично максимальної кількості редукуючих цукрів вивільняється протягом 72-х годин. За допомогою центрифугування й ультрафільтрації, 60-70 % ферментативної активності виділяють у ретентаті, у той час як фільтрат містить більше ніж 80 % вивільнених редукуючих цукрів. Шляхом повторного використання ретентата, або як є, або після додаткового очищення й/або концентрації, дозування ферменту протягом наступної стадії гідролізу може бути знижено на від 60 до 70 %. Зниження витрат, що досягається шляхом застосування розкладаючих целюлозу стабільних ферментів, таких як ферменти з *Talaromyces*, у цьому випадку відбувається в результаті виконання вимоги зменшення дозування ферменту.

Повторне застосування ферментів після зрідження зі стабільними ферментами

Наприкінці зрідження, ферменти, які використовуються при зрідженні можуть бути перероблені таким же чином, як описано вище для утилізації після гідролізу (зрідження і оцукрювання).

Повторне застосування ферментів після гідролізу в комбінації із продукцією ферментів і повторним застосуванням клітин дріжджів зі стабільними ферментами

Спосіб, що включає повторне застосування ферментів після гідролізу, як описано вище, може бути скомбінований з повторним застосуванням продукуючих етанол мікроорганізмів після ферментації й із застосуванням фільтрату, що містить редукуючі цукри, у якості субстрату (очищеного й/або сконцентрованого або розведеного) у ферментації фермент-продукція й у якості субстрату для культивування етанол-продуючих мікроорганізмів.

Повторне застосування ферментів після перегонки за зниженого тиску зі стабільними ферментами

Термостабільність ферментів, таких як ферменти з *Talaromyces*, приводить до збереження целюлолітичної активності після гідролізу, ферментації й перегонки за зниженого тиску в тонкій барді. Повна активність ферменту знижується протягом трьох послідовних етапи способу з 10-15 одиницями субстрату на г сировини сухої речовини, незалежно від початкової дози ферменту. Таким чином, тонка барда, отримана після перегонки за зниженого тиску, може бути

застосована повторно в якості джерела ферменту для знову запущеного циклу гідролізу-ферментація-перегонка способу перетворення попередньо обробленої пшеничної соломи в етанол. Тонка барда може бути застосована або в сконцентрованій або (не)розведений формі й/або може бути очищена з додатковим додаванням ферменту або без нього. Тонка барда, за
 5 необхідності очищена, може бути повторно використана для скраплення або гідролізу целюлозного матеріалу.

Винахід далі буде описаний за допомогою наступних прикладів, які не повинні розглядатися як обмежуючі обсяг винаходу.

Приклади

Матеріали й методи

Визначення в'язкості

Вимірювання RVA (Rapid Visco Analyser) проводили з використанням швидкого аналізатора в'язкості Ньюпорт RVA-4, оснащеного пластиковою лопаткою (див. D.L.Goode et al, Journal of the
 10 Institute of Brewing, Vol. 111, No. 2, 2005).

Ферменти

TEC-210 целюлазну композицію піддавали ферментації згідно з процедурами інокуляції й ферментації, описаними в WO201 1/000949.

Rasamsonia (Talaromyces) emersonii був депонований в CENTRAAL BUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, Uppsalalaan 8, P.O. Box 85167, NL-3508 AD Утрехт, Нідерланди, у грудні
 20 1964 року, з кодом доступу CBS 393.64.

Інші придатні штами можуть бути рівною мірою використані в даних прикладах для демонстрації ефекту й переваг винаходу. Наприклад, TEC-101, TEC-147, TEC-192, TEC-201 або TEC-210 є придатними штамами Rasamsonia, які описані в WO2011/000949.

Ендоглюканази (EG) одержують шляхом суперекспресії EBA8 в Aspergillus Niger, як описано в WO201 1/098577 з подальшою ферментацією Aspergillus Niger трансформанту. EBA8 є Rasamsonia emersonii (Talaromyces emersonii) ендоглюканаза, яка описана в WO201 1/098577, як T. emersonii бета-глюканаза CEA (EG) і представлена SEQ ID NO: 3 в WO2011/098577.

Одержання попередньо обробленого кислотою субстрату з кукурудзяної соломи

Попередньо оброблену розведеною кислотою кукурудзяну солому (aCS) одержували, як описано в роботі Schell, D.J., Applied Biochemistry і Biotechnology (2003), vol. 105-108, pp 69-85. Застосовували напівпромисловий реактор для попередньої обробки, який працював за стаціонарних умов при 190 °C, тривалість обробки – 1 хв. і ефективна концентрація кислоти H₂SO₄ дорівнювала 1,45 % (мас./мас.) у рідкій фазі.

Приклад 1

Вплив ендоглюканази впродовж гідролізу дігноцелюлозної сировини

Вплив ендоглюканази впродовж гідролізу лігноцелюлозної сировини описаний відповідно до процедур, описаних нижче. Реакції гідролізу проводили з сировиною у вигляді попередньо оброблених кислотою стебел кукурудзи (ACS). Значення рН сировини доводили до рН 4,5 за допомогою розчину 4 M NaOH. Реакцію гідролізу проводили у два етапи:

1. Етап скраплення, що здійснювався в безперервному режимі.

2. Етап оцукрювання, що здійснювався в серійному режимі.

Скраплення проводили в такий спосіб: реактор скраплення був заповнений 1 кг 10 % (мас./мас.), сировиною у вигляді попередньо оброблених кислотою стебел кукурудзи. Реактор працював при постійному перемішуванні, контролі за рН (рН 4,5, 4N NaOH) і 62° C. Безпосередньо після заповнення, вводили фермент (таблиця 1), щоб почати реакцію гідролізу. Далі, кожні 10 хвилин додавали 55 г сировини на 30 % сухої речовини, яку було додано до реактора скраплення при постійному спуску вмісту реактора для того, щоб підтримувати рівень заповнення реактора постійно на рівні 1 літра. Крім того, додатково вводився фермент разом з додатковою сировиною для підтримки постійного співвідношення ферменту/субстрату у ході реакції. Приблизно через 3 години рівень сухої речовини в реакторі досягав близько 20 % (мас./мас.) і до сировини додавали суху речовину для того, щоб компенсувати зниження до 20 % (мас./мас.), щоб зберегти рівень сухої речовини в реакторі на рівні приблизно 20 % (мас./мас.). Через 6 годин після початку скраплення, вміст з реактора скраплення транспортували до реактора оцукрювання для подальшої обробки. Час перебування в реакторі скраплення становив в середньому близько 3 годин.

Оцукрювання проводили в такий спосіб: реактор оцукрювання був заповнений тим, що відібрано з реактора скраплення в загальному реакційному обсязі близько 1 літра. Це відбувалося близько 3 годин. Реактор працював при постійному перемішуванні, контролі рН (рН 4,5, 4N NaOH) і 62° C. Під час заповнення фермент був доданий одночасно в одному з дослідів, як показано в таблиці 1. Реакція оцукрювання здійснювалась протягом приблизно 70 годин.

Таблиця 1

Схема дозування ферменту

Експеримент	Скраплення		Оцукрювання	
	Ендоглюконаза	Целюлазний коктейль	Ендоглюконаза	Целюлазний коктейль
1	1 мг/г	-	-	4 мг/г
2	1 мг/г	4 мг/г	-	-

• Целюлазний коктейль: TEC-210

• Ендоглюканаза: EBA8

5 • Дози ферменту: мг ТСА білку на грам сухої речовини сировини

Після гідролізу, зразки охолоджували на кризі й відразу 50 мкл кожного супернатанта розводили в 1450 мкл води I класу. Потім розведений супернатант фільтрували (фільтр 0,45 μ m, Pall PN 454) і фільтрати аналізували на вміст цукру, як описано нижче.

10 Концентрації цукру в розведених зразках вимірювали за допомогою HPLC, обладнаного Aminex HPX-87P колонкою (Biorad #1250098) шляхом елюювання з водою при 85 °C зі швидкістю потоку 0,6 мл у хвилину й підрахунком шляхом інтегрування зафіксованих сигналів глюкози з рефракційного індексу (RI) відкаліброваного за допомогою стандартних розчинів глюкози.

15 Дані, представлені на Фіг. 1, показують, що вивільнення глюкози із сировини, яка піддавалась попередній обробці ендоглюканазами, відбувалось швидше й давало більш високі результати (наприклад, після 72 годин), чим із сировини, куди ендоглюканази й TEC-210 целюлазний ферментний коктейль були додані одночасно.

20 На підставі цих результатів був зроблений висновок, що скраплення лігноцелюлозної сировини з ендоглюканазою, з вмістом ферментної композиції, збільшує целюлолітичну продуктивність целюлазних сумішей.

Приклад 2

Ефект ендоглюканази на етапі скраплення

25 Зразки 20 % сухої речовини попередньо обробленої сировини (стебла кукурудзи оброблені кислотою) з pH 4,5 у воді попередньо нагрівають при 62 °C у Newport RVA-4 протягом однієї години при низькій швидкості перемішування. Фермент був доданий в нульовий момент вимірювання часу, протягом наступних двох годин при 62° C фіксувалося зменшення в'язкості, яке реєструвалося підключеним комп'ютером.

30 Результати представлені в таблиці 2, показують, що EG (EBA8) покращує зниження в'язкості для біомаси субстрату, а також, що такий запуск процедури періодично може використовуватись для запуску процесу винаходу.

Таблиця 2

	Час за який досягається 4000 cP	Час за який досягається 2000 cP	Час за який досягається 1000 cP	Час за який досягається 500 cP
1.0 мг TEC-210/г TS		3000	4000	
(0.5 мг TEC-210+0.5 мг EG)/г TS		500	2500	3620
2.0 мг TEC-210/г TS	500	2000		
(1.0 мг TEC-210+1.0 мг EG)/г TS	100	400		

Приклад 3

Вплив температури на скраплення лігноцелюлозної сировини

35 Цим експериментом демонструється вплив температури на скраплення лігноцелюлозної сировини на ендоглюканазу. Експерименти скраплення проводили з використанням сировини попередньо оброблених кислотою кукурудзяних стебл (ACS), отриманих з NREL (Національної лабораторії поновлюваної енергії).

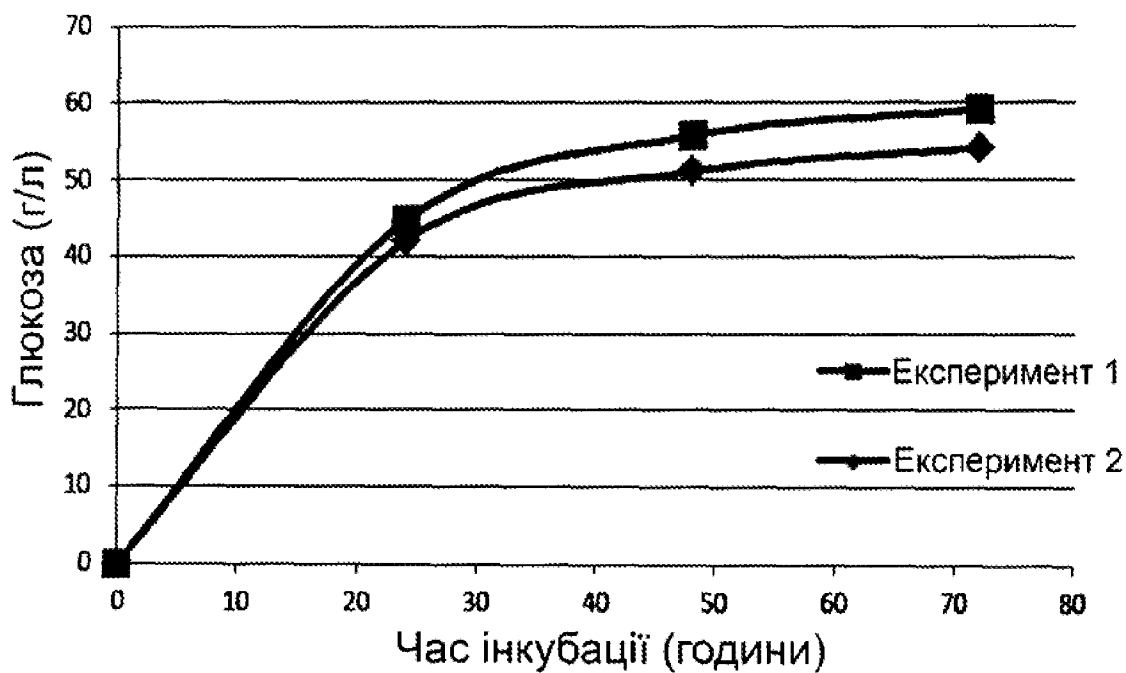
40 Зразки 24 % сухої речовини попередньо обробленої сировини із pH 4,5 у воді, попередньо підігрівались у Newport RVA-4 впродовж однієї години з перемішуванням низької швидкості.

Фермент (0,2 мг EG [EBA8] на грам сухої речовини) був доданий в нульовий момент вимірювання часу, протягом наступних 60 хвилин фіксувалось зменшення в'язкості, яке реєструвалось підключеним комп'ютером. Інкубація здійснювалась при 62, 70 і 75 °С.

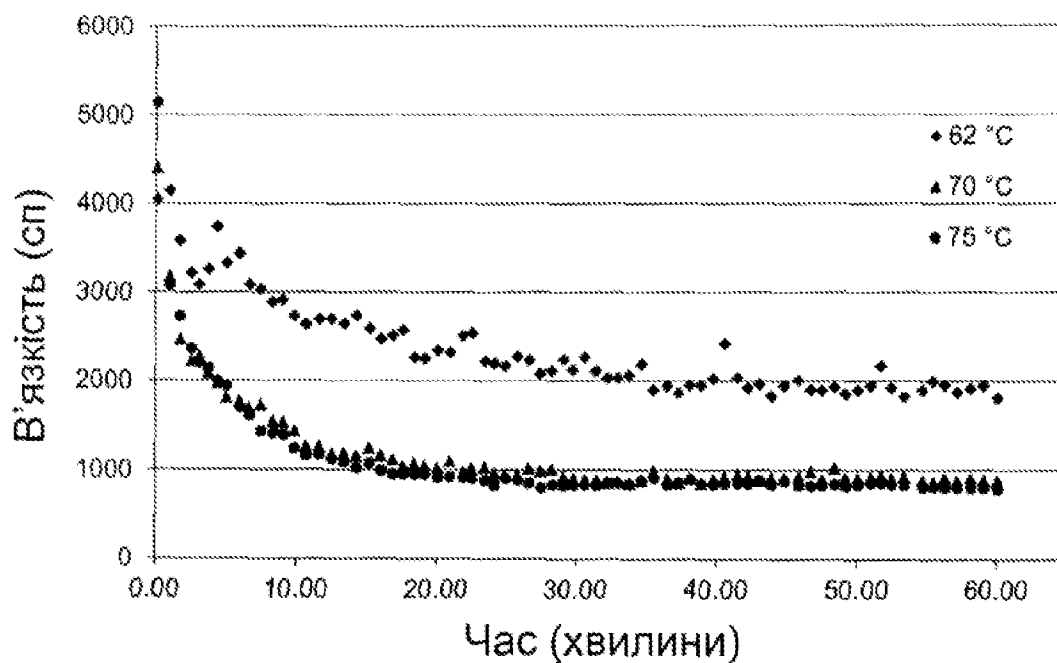
- Результати представлені на Фіг 2, показують, що EG (EBA8) може скраплювати лігноцелюлозну сировину за температури до 75 °С і за більш високих температур, які призводять до зниження в'язкості.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб гідролізу біомаси целюлози, який включає:
етап скраплення, на якому додають перший фермент або першу ферментну композицію з метою розрідження щонайменше частини твердих часток, які присутні у біомасі, та з отриманням коефіцієнта зниження в'язкості, який дорівнює щонайменше 2, за яким іде етап оцукрювання, на якому додають другу ферментну композицію з метою формування олігомерних та/або мономерних цукрів; і
причому перший фермент або перша ферментна композиція відрізняється від другої ферментної композиції;
причому перший фермент або перша ферментна композиція включає ендоглюканазу;
причому друга композиція містить фермент целюлази; і
причому перший фермент або перша ферментна композиція містить більше ендоглюканази (вираженої в мас. % білка), ніж друга ферментна композиція;
де вміст сухої речовини на етапі скраплення становить 15 мас. % або вище;
де етап скраплення здійснюють при температурі 60 °С або вище;
де етап оцукрювання здійснюють при температурі 60 °С або вище.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що етап скраплення відбувається в реакторі (реакторі скраплення), який має об'єм менший за об'єм реактора, у якому відбувається етап оцукрювання (реактор оцукрювання).
3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що співвідношення об'єму реактора скраплення й об'єму реактора оцукрювання становить від 1:2 до 1:50.
4. Спосіб за будь-яким із пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що реактор скраплення та/або реактор оцукрювання мають об'єм, більший за 1 м³.
5. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що друга ферментна композиція містить щонайменше дві різні целобіогідролази й необов'язково бета-глюкозидази та/або GH61.
6. Спосіб за будь-яким із пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що на стадії скраплення чи в реакторі скраплення використовують менше ферменту (на суху речовину білка) на одиницю об'єму реактора, чим додається на етапі, на якому формуються олігомерні та/або мономерні цукри або в реакторі гідролізу мономерних цукрів.
7. Спосіб за будь-яким із пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що перший фермент або перша ферментна композиція і/або другий фермент або ферментна композиція містять термостабільний фермент.
8. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що етап скраплення здійснюється з підживленням, в напівбезперервному чи безперервному режимі.
9. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що етап оцукрювання відбувається з підживленням, в напівбезперервному або серійному режимі.
10. Спосіб за будь-яким із пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що на стадії скраплення вміст сухої речовини складає 20 мас. % або більше.
11. Спосіб за будь-яким із пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що етап скраплення проводять за температури 65 °С або вище.
12. Спосіб за будь-яким із пп. 1-11, який **відрізняється** тим, що тривалість скраплення становить 10 годин або менше.
13. Спосіб за будь-яким із пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що тривалість скраплення становить 40 годин або менше.
14. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що додатково містить етап ферментації.
15. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що етап ферментації здійснюють за допомогою мікроорганізму, який здатен ферментувати щонайменше один C5 цукор.



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601