



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112837** (13) **C2**
(51) МПК**C12P 7/10** (2006.01)**C12P 7/18** (2006.01)**C12P 19/14** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2012 02582	(72) Винахідник(и):	Факлер Карін (АТ), Месснер Курт (АТ), Кронгтаєв Чуларат (ТН/АТ), Ертл Ортвін (АТ)
(22) Дата подання заявки:	30.04.2010	(73) Власник(и):	АННІККІ ГМБХ, Rankengasse 28a, A-8020 Graz, Austria (АТ)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.11.2016	(74) Представник:	Шевеля Микола Васильович, реєстр. №20
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	A1252/2009, A1496/2009, A2030/2009	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Marton R. & Granzow S. Ethanol-alkali pulping // TAPPI. - 1982. - Vol.65, №6, - P. 103-106 Avgerinos G.C. & Wang D.I.C., Selective Solvent Delignification for Fermentation Enhancement. Biotechnology and bioengineering. - 1983. - Bd. 25, - № 1, - p. 67-83 Jeffries T.W., Enzymatic removal and utilization of hemicellulose from pulps; paper pulping; xylan saccharification using endo-1,4-beta-D-xylanase from Aureobasidium pullulans; xylitol and ethanol preparation using Candida shehatae. - 1990
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	06.08.2009, 23.09.2009, 23.12.2009		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	АТ, АТ, АТ		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.04.2012, Бюл.№ 7		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.11.2016, Бюл.№ 21		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/АТ2010/000138, 30.04.2010		

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПРОДУКТІВ РОЗЩЕПЛЕННЯ ВУГЛЕВОДІВ З ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНИХ МАТЕРІАЛІВ**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу одержання продуктів розщеплення вуглеводів, який полягає в тому, що лігноцелюлозний матеріал обробляють водним розчином, що містить спирт, зокрема C₁₋₄ спирт або фенол, при температурі від 40 °С до 100 °С, крім 60 °С, та при значенні рН від 11,0 до 14,0. При цьому одержаний збагачений целюлозою й геміцелюлозою матеріал, обробляють щонайменше одним ферментом, що розщеплює вуглеводи, для того, щоб одержати продукти розщеплення вуглеводів.

UA 112837 C2

Даний винахід стосується способу одержання продуктів розщеплення вуглеводів, зокрема цукрів, таких як пентози й гексози, з лігноцелюлозних матеріалів. Далі, винахід стосується способу одержання спирту із цукрів. Для цілей даного опису й даної заявки поняття "цукор" включає також поняття "олігомери цукру".

У зв'язку з дефіцитом сирої нафти й обговоренням можливості застосування зерна як джерела енергії, поновлювана сировина лігноцелюлоза (солома, деревина, паперові відходи й т.д.) здобуває велике значення як вихідний матеріал для пального або хімічних продуктів. Перетворення лігноцелюлози може відбуватися двома основними різними шляхами: 1) "Thermochemical Platform" (термохімічна платформа), у якому лігноцелюлозу спочатку газифікують і із синтезу-газу синтезують бажані продукти, і 2) "Sugar Platform" (цукрова платформа), у якому головний інтерес для використання представляє зв'язаний у полімерах целюлози й геміцелюлози цукор, у той час як лігнін переважно використовується для енергетичних цілей. Даний винахід стосується другого шляху.

На противагу крохмалю цукор лігноцелюлози перебуває в тісно зв'язаних полімерних кристалічних структурах целюлози й геміцелюлози, які додатково захищені оболонкою лігніну, внаслідок чого виходить найвищою мірою щільний комплекс. Самим очевидним способом одержання цукрів з лігноцелюлози було б безпосереднє використання целюлаз і геміцелюлаз. Однак даний спосіб є скрутним для соломи або деревини як вихідної сировини через щільність вищезгаданого комплексу. Через високу молекулярну масу ферменти не здатні проникати через вузькі пори лігноцелюлози. Це означає, що в першу чергу необхідно прийняти міри для підвищення пористості лігноцелюлози, щоб внаслідок цього уможливити наступне ферментне перетворення в цукор.

Цю першу стадію позначають як "Pretreatment" (попередня обробка, підготовка). Дана підготовка завжди є дуже дорогою, так, наприклад, при одержанні "second generation biofuels" (удруге перероблене біопаливо) на підготовку витрачаються до 1/3 виробничих витрат, що негативно впливає на рентабельність. Метою застосовуваних способів є або перетворення вихідної геміцелюлози в рідкий стан (наприклад, steam explosion, dilute acid-pretreatment) (паровий вибух, попередня обробка розведеними кислотами) або підвищення пористості шляхом перетворення в рідкий стан лігніну (наприклад, lime-, ammonia-pretreatment) (обробка вапном, аміаком).

Субстрат з обробленої лігноцелюлози може піддаватися подальшій ферментній обробці для одержання цукрів або їх олігомерів, причому вид попередньої обробки може сильно впливати на ферментативну активність і вихід продукту. При високій температурі реакції часто утворюються токсичні продукти розкладання (наприклад, фурфурол), які у випадку безпосередньо наступного за цим етанольного зброджування можуть перешкоджати дріжджам; див. наприклад, Chandra et al., *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108:67, 2007; Mansfield et al., *Biotechnol. Prog.* 15:804, 1999.

Дані способи мають істотний недолік, що полягає в тім, що вони є енергозатратними й переважно протікають при температурах майже 200°C.

Технологічне вдосконалення в даній області, наприклад за допомогою розробки низькотемпературного способу, (тобто протікаючого при температурі до 100°C), означало б вирішальний прогрес у будь-якому застосуванні лігноцелюлози як сировини. Це є завданням даного винаходу.

З EP 1025305 B1 відомий хімічний спосіб деполімеризації лігніну (Cu-система). Даний спосіб ґрунтується на каталітичній дії міді, яка утворює комплекси, в сполученні з пероксидом водню або органічними гідропероксидами, і уможливорює розщеплювати лігнін окислюванням при температурі нижче 100°C. Застосовувані при цьому комплексоутворювачі являють собою похідні піридину. Для синтетичних моделей лігніну було підтверджено, що при застосуванні H₂O₂ як окислювача відбувається розщеплення простих ефірних зв'язків молекул лігніну, внаслідок чого полімери лігніну розпадаються на олігомери. При застосуванні Cu-систем з надлишком органічних гідропероксидів можливо делігнофікувати деревину. Заснована на H₂O₂ система була технічно краще в реалізації, випробовувалася як вибілююча добавка при перекисному вибілюванні крафтцелюлози й приводила до поліпшення делігнофікування й підвищення ступеня білизни.

Далі, з "Oxidation of wood and its components in water-organic media", Chupka et al., *Proceedings: Seventh International Symposium on wood and pulping chemistry*, Vol. 3, 373-382, Beijing P.R. China, 25.-28. May 1993, відомо, що ефективність лужного каталізу окислювання деревини й лігніну значно зростає, якщо до водного реакційного середовища додавали органічний розчинник, наприклад DMSO, ацетон, етанол. Далі автори вказують, що при значеннях pH більше 11 відбувався різкий ріст окислювання деревини й лігніну.

З WO 01/059204 відомий спосіб одержання целюлози, у якому вихідний матеріал піддається попередній обробці, причому даний матеріал обробляють із буферним розчином і каталізатором делігнофікування (перехідний метал). Делігнофікування проводять у присутності кисню, перексиду водню або озону.

На противагу цьому, відповідно до способу по винаходу, одержання продуктів розщеплення вуглеводів, зокрема цукрів, відрізняється тим, що:

- лігноцелюлозні матеріали обробляють водяними розчинами, які містять спирт, зокрема C₁₋₄-спирт або фенол, і мають значення рН від 11,0 до 14,0 для того, щоб розщепити лігноцелюлозу й відокремити продукти розщеплення від матеріалу, при цьому одержують матеріал, насичений целюлозою й геміцелюлозою; і

- отриманий, насичений целюлозою й геміцелюлозою матеріал обробляють ферментом, що розщеплює вуглеводи, для того, щоб одержати продукти розщеплення вуглеводів.

Як спирти придатні аліфатичні або циклоаліфатичні, одно- або багатоатомні спирти або феноли, як наприклад, C₁₋₆ спирти, зокрема C₁₋₄ спирти, такі як метанол, етанол, пропанол і бутанол, включаючи їхні ізомери; гліколі (етандіол, пропан-, бутан-, пентан-, гександіолі), гліцерин, пропенол, бутенол, циклопентанол, циклогексанол, бензиловий спирт; або феноли, такі як феноли, крезоли, катехоли, нафтоли, а також аміноспирти, такі як етанолумін, метанолумін і гексаноламін. Кращими є C₁₋₄ спирти. Для цілей даної заявки феноли включені у видове поняття "спирти".

Крім того спиртові розчини екстрактів лігніну виявляють вигідні переваги в наступній переробці продуктів розщеплення лігніну або ксилану.

Відповідно до способу по винаходу спирт перебуває у водяному розчині переважно в кількості від 10 до 70 об. %, наприклад від 20 до 50 об. %, переважно від 30 до 40 об. %.

Відповідно до способу по винаходу лігноцелюлозні матеріали перебувають у водяному розчині переважно в концентрації від 3 до 40 мас. %, наприклад, від 5 до 40 мас. %, зокрема від 5 до 20% мас. %.

Краще розщеплення лігноцелюлози відбувається при температурі нижче 100°C, наприклад, нижче 80°C або нижче 60°C.

Значення рН можна встановлювати основою, переважно неорганічною основою, наприклад розчином їдкого натру.

Даний винахід ґрунтується на даних, що лігноцелюлозні матеріали, оброблені основним водяним розчином, що містить спирт, зокрема C₁₋₄ спирт або фенол і має значення рН від 11,0 до 14,0, можуть бути ферментативно перероблені з більше високим виходом продуктів розщеплення вуглеводів, таких як цукрів, а також інших видів делігнофікованих матеріалів, зокрема без додавання спиртів.

Як продукти розщеплення вуглеводів переважно утворюються цукри, головним чином пентоза й гексоза. Кращими цукрами є також ксиліза й глюкоза.

Кращий варіант здійснення способу по винаходу відрізняється тим, що матеріали, насичені целюлозою й геміцелюлозою обробляють ксиланазою і целюлазою для того, щоб одержати цукор.

У якості лігноцелюлозних матеріалів переважно застосовують соломі, енергетичні злаки, такі як просо прутковидне, міскантус, абака, сизаль, багасса, або нетипові лігноцелюлозні матеріали, такі як оболонка зерна (лузга), наприклад рисова лузга; переважно використовують соломі, енергетичні злаки, багассу або лузгу, особливо переважно застосовують соломі або багассу, наприклад, соломі. Солома має сильно гідрофобну поверхню, так що змочування водяними розчинами представляє проблему. Виявили, що за допомогою використання спирту стало можливим, без застосування тиску вводити реакційний розчин у пори матеріалу й наявне повітря замінити реакційним розчином. Надалі виявилось, що спирт прискорює екстракцію продуктів розщеплення із соломи й сприяє тому, щоб продукти розщеплення лігніну залишалися в розчині. Надалі виявилось, що на противагу цьому через спирт розчинність геміцелюлози й продуктів її розщеплення знижується й, таким чином, геміцелюлоза залишається в матеріалі.

Завдяки видавлюванню рідкої фази із субстрату, відповідно до способу розщеплення, концентрація субстрату підвищується, внаслідок чого потрібна менша кількість ферментів для ферментативного гідролізу або для іншої наступної ферментативної переробки.

При виробництві спирту вартість ферментів є вирішальним чинником витрат. Наявність спирту приводить до того, що розчинність у лужному середовищі протягом реакції вивільнених додатково до лігніну геміцелюлози і її продуктів розщеплення сильно знижується й вони залишаються зв'язаними із субстратом. Перевагою для процесу є висока вибірковість витягу лігніну, у випадку відділення екстракційного розчину від твердих речовин концентрація геміцелюлози й продуктів її розщеплення в екстракційному розчині занадто низька, тому що

геміцелюлоза залишається у твердій речовині й, внаслідок цього зберігається для ферментативного гідролізу й одержання цукру.

Спиртовий розчин екстракту лігніну надає гарні можливості для подальшої переробки лігніну й одержання продуктів з лігніну.

5 Надалі виявилось, що розкладання геміцелюлози значною мірою запобігається при застосуванні спирту, зокрема, C₁₋₄ спирту або фенолу, у випадку лужної підготовки при менш ніж 100°C, так що майже вся геміцелюлоза залишається для наступного ферментативного розщеплення й перетворення ксилози в більш цінні продукти й не розкладається частково при підготовці, як в інших способах, і виділяється як суміш лігнін/цукор.

10 Завдяки підготовці до проведення делігнофікування пористість стінок клітин лігноцелюлозних матеріалів підвищується, наприклад, у випадку соломи пористість підвищується настільки високо, що майже вся ксилоза стає доступною для ксиланази, приблизно 100% ксиланів гідролізується й вся ксилоза може бути отримана. Цей факт робить даний спосіб відповідно до даного винаходу особливо придатним для того, щоб робити більше

15 цінні продукти в сполученні з ферментативним перетворенням ксилози. Ферментативне перетворення може при цьому відбуватися або безпосередньо в суміші розчину ксилози й твердих речовин, або у відділеному від твердих речовин розчині ксилози.

Відповідно до способу по винаходу надалі за ферментативним гідролізом ксиланів і перетворенням ксилози в ксилітол виробництвом спирту із твердих речовин, що залишилися, вартість ферментів є вирішальним чинником витрат. Частково витрати впливають із неспецифічних зв'язків ферментів з лігніном, див., наприклад, Chandra et al., 2007. Часткове видалення лігніну скорочує цю втрату активності й мало відбивається на витратах.

20 Перевагою наступного ферментативного способу є, наприклад те, що з високої вибіркової витягу лігніну при майже повнім збереженні полімерів цукру потрібна дуже низька концентрація геміцелюлози й продуктів її розщеплення в екстракційному розчині, геміцелюлоза залишається у твердих речовинах і внаслідок цього зберігається для ферментативного гідролізу й одержання цукру, а також для їхнього наступного перетворення. Виходячи із цього одержують відповідно до способу по винаходу максимальний відсоток використання матеріалу й, наприклад, у сполученні із застосуванням ксилозодегідрогенази, високу рентабельність описаного процесу.

30 Проведення процесу перетворення ксилози в ксилітол може відбуватися після ферментативного вивільнення ксилози безпосередньо у твердій речовині/рідкій суміші, які одержують відповідно до способу по винаходу, що підвищує рентабельність загального процесу.

У випадку перетворення з одержанням ксилітолу може бути використаний спирт, що залишився, із процесу підготовки, після віджиму твердих речовин, безпосередньо як субстрат для алкогольдегідрогенази для відновлення NAD в NADH. Якщо процес розрахований таким чином, що для цього витрачаються залишки спирту, що залишаються в реакційній суміші зі стадії підготовки (частково), видалення зайвого спирту з розчину продуктів (частково) більш непотрібно й внаслідок цього збільшується ефективність загального процесу.

40 У випадку перетворення продуктів розщеплення лігніну спирт діє як Radikal-Scavenger (акцептор радикалів) і розчинник для продуктів розщеплення, отриманих у ході ферментативної, біоміметичної або хімічної деполімеризації високомолекулярних продуктів розщеплення лігніну в низькомолекулярні.

Незначний вміст геміцелюлози й продуктів її розщеплення в екстракті й підвищена розчинність лігніну, підвищують норми пропускної здатності при відділенні твердих речовин від продуктів перетворення, а також при їхній фільтрації.

Відповідно до способу по винаходу можна, наприклад, розділяти три основних компоненти соломи, а саме глюкози, ксилози, а також лігніну в дуже бідних речовиною масових потоках і потім перетворювати їх у цінні продукти, такі як ксилітол, і виконувати в такий спосіб вимоги

50 ідеального способу біопереробки.

Наступна перевага способу по винаходу порівняно з іншими способами підготовки, які головним чином протікають у температурному діапазоні від 150°C до 200°C, полягає в тому, що температура може залишатися нижче 100°C. Низькі енерговитрати дозволяють використовувати отриманий при підготовці лігнін не як джерело енергії для процесу підготовки, а як цінний матеріал.

55 Після обробки водяним розчином спирту, зокрема C₁₋₄ спирту або фенолу, який містить H₂O₂, відповідно до способу по винаходу, розчин, що містить лігнін відокремлюють і підготовлену тверду речовину переважно обробляють ксиланазою, наприклад, 6-72 годин при 30-90°C, і потім відокремлюють рідку фазу від твердої речовини, після чого рідку фазу переважно перетворюють, з утворенням побічних продуктів, наприклад, ксилітолу.

60 Після обробки водяним розчином спирту, зокрема C₁₋₄ спирту або фенолу, який містить H₂O₂, відповідно до способу по винаходу, розчин, що містить лігнін відокремлюють і підготовлену тверду речовину переважно обробляють ксиланазою, наприклад, 6-72 годин при 30-90°C, і потім відокремлюють рідку фазу від твердої речовини, після чого рідку фазу переважно перетворюють, з утворенням побічних продуктів, наприклад, ксилітолу.

Після відділення рідкої фази тверду речовину, що залишається, переважно обробляють целюлозою, причому за допомогою наступної ферментації твердої речовини/розчину глюкози можна одержувати етанол, бутанол або інші продукти ферментації; або тверду речовину, що залишилася, піддають термічному або термохімічному перетворенню й відокремлюють

отримані продукти, такі як компоненти палива, присадки до палива й/або інші хімічні продукти, як наприклад феноли; або тверду речовину, що залишилася, піддають мікробіологічному перетворенню за допомогою бактерій, дріжджів або грибів; або тверду речовину, що залишилася, піддають наступній стадії делігнофікування з метою одержання целюлозних волокнистих матеріалів.

Тверде паливо, що залишилося, можна ферментувати в пристрої для одержання біогазу й переробляти в біогаз.

Одним із самих економічно цікавих побічних продуктів ксилози є ксилітол.

Основне джерело для одержання ксилози являє собою варильний луг із целюлозного виробництва, що містить безліч продуктів розщеплення, переважно лігніну й геміцелюлози, внаслідок чого ксилозу повинні одержувати в ході дорогих стадій відділення й очищення. Так, наприклад, у роботі H. Harms "Willkommen in der natürlichen Welt von Lenzing weltweit führend in der Cellulosefaser Technologie", Herbsttagung der österreichischen Papierindustrie, Frantschach (15.11.2007) описане одержання ксилози з концентрованого луку способом гель-фільтрації, технічно дуже складним способом, що звичайно не знаходить застосування для масових продуктів. Отриману в такий спосіб ксилозу перетворюють потім у ксилітол.

У наступному аспекті способу по винаходу отримана ксилоза вільно за допомогою ферментації перетворюється в ксилітол перетворенням із ксилоредуктазою, наприклад, із ксилородегідрогеназою, наприклад з *Candida tenuis*, причому при необхідності до розчину ксилози додають ксилоредуктазу косубстрат для регенерації кофактора, алкогольдегідрогеназу, NAD(P)H; при цьому отриманий ксилітол відокремлюють фільтрацією від продуктів розщеплення лігніну.

Наступним прикладом 1 і порівняльним прикладом 1A підтверджується вплив попередньої обробки в присутності спирту на вихід відновленого цукру після ферментативного гідролізу.

Приклад 1

Попередня обробка соломи пшениці.

Солому пшениці подрібнювали до часток розміром близько 2 см. 5 г здрібненої соломи пшениці суспендували в реакційній посудині обсягом 500 мл в 200 мл розчину, що складається з 49,5% води, 50% етанолу й 0,5% пероксиду водню. Суспензію нагрівали на водяній бані до 50°C, термостатували й установлювали значення pH суспензії водняним розчином NaOH на кінцеве значення pH, рівне 12. Суміш безупинно перемішували на магнітній мішалці зі швидкістю 200 обертів у хвилину, при 60°C, 24 години. Потім тверду частину фільтрували й промивали 1 л дистильованої води.

Для ферментативного гідролізу паралельно в кожних 100 мг підготовленого субстрату встановлювали pH за допомогою 9,8 мл 50 mM буферного розчину ацетату натрію на значення 4,8 і змішували з 200 мкл суспензії Accellerase 1000 (www.genencor.com). Accellerase являє собою суміш ферментів із целлюлази й геміцелюлази. Ферментативний гідроліз проводили при 50°C у вібро-водяній бані. Вивільнені після 48 годин розчинні мономери з гексози й пентози визначали у вигляді відновленого цукру ДНК методом (Miller et al., Analytical Chemistry 31(3):426,1959) в 1 мл рідкої фракції, відносили до маси зваженого, попередньо обробленого субстрату й переводили у відсотки від максимального теоретичного виходу продукту.

Теоретичний максимальний вихід відновленого цукру визначали окремо, і він склав 705 мг $\pm$ 5% на г непідготовленої соломи.

За один експеримент проводили 5 паралельних дослідів. Вихід відновленого цукру склав 99% $\pm$ 4%.

Порівняльний приклад 1A

Повторювали приклад 1, тільки без додавання спирту. Вихід відновленого цукру склав лише 64% $\pm$ 3%.

Приклад 2

Попередня обробка соломи пшениці.

Солому пшениці подрібнювали до часток розміром близько 2 см. 2,5 г здрібненої соломи пшениці суспендували в реакційній посудині обсягом 500 мл в 200 мл розчину, що складає з 49,5% води, 50% ізопропанолу. Суспензію нагрівали на водяній бані до 50°C, термостатували й установлювали значення pH суспензії водняним розчином NaOH на кінцеве значення pH, рівне 13 (або 14). Суміш безупинно перемішували на магнітній мішалці зі швидкістю 200 обертів у

хвилину, при 60°C, 24 години. Потім тверду частину фільтрували й промивали 1 л дистильованої води.

Для ферментативного гідролізу паралельно в кожних 100 мг підготовленого субстрату встановлювали pH за допомогою 9,8 мл 50 mM буферного розчину ацетату натрію на значення 4,8 і змішували з 200 мкл суспензії Accellerase 1000 (www.genencor.com). Accellerase являє собою суміш ферментів із целюлози й геміцелюлози. Ферментативний гідроліз проводили при 50°C у вібро-водяній бані. Вивільнені після 48 годин розчинні мономери з гексози й пентози визначали у вигляді відновленого цукру ДНК методом в 1 мл рідкій фракції, відносили до маси зваженого, попередньо обробленого субстрату й переводили у відсотки від максимального теоретичного виходу продукту.

Теоретичний максимальний вихід відновленого цукру визначали окремо, і він склав 705 мг+/-5% на г непідготовленої соломи.

За один експеримент проводили 5 паралельних дослідів. Вихід відновленого цукру склав 97%+/-4%.

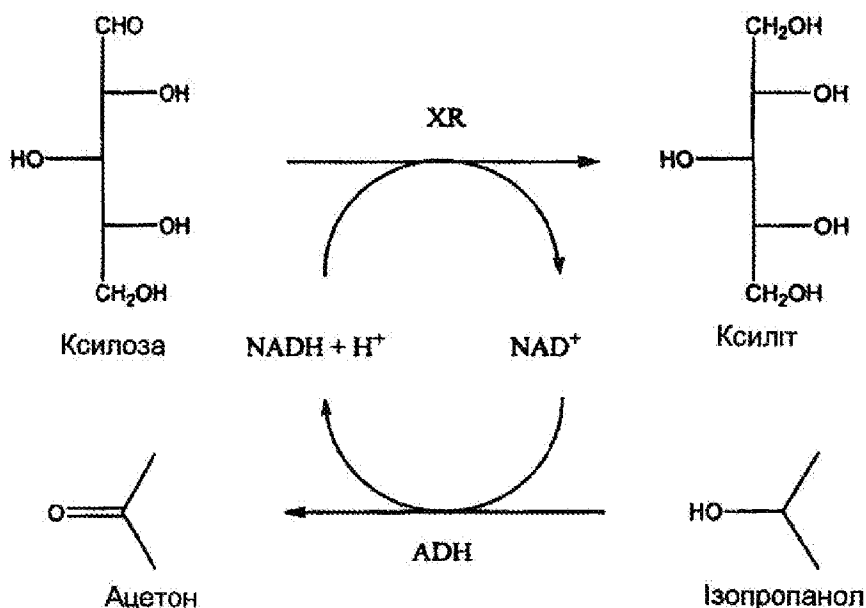
15 Приклад 3

Робили ферментативний ксилітол з розчину ксилози, що була отримана із соломи відповідно до способу, описаному в прикладі 2. У якості косубстрату застосовували ізопропанол.

Реакційний розчин містив 5 мг/мл ксилози.

20 Ксилоредуктаза (XR) з *Candida tenuis* відновлює ксилозу до ксилітолу. Дана XR має потребу в коферменті NADH (нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений), що при реакції окислюється до коферменту NAD⁺. Відновлення окисленого кофактора відбувається за допомогою паралельної дії алкогольдегідрогенази (ADH: зв'язана регенерація ферментів). У якості косубстрату застосовували ізопропанол. Ізопропанол й NAD⁺ за допомогою ADH перетворюються в NADH й ацетон, ж показано на схемі реакції 1 :

СХЕМА РЕАКЦІЇ 1



У таблиці 1 представлені реакційні співвідношення в 5 різних дослідях № 049, № 050, № 051, № 052, № 053 й № 054:

Таблиця 1

Номер реакції	#049	#050	#052	#053	#054
Зразок субстрата I [мкл]	250	250	250	500	500
XR <i>C.tenuis</i> 2 Е/мл [мкл]		50	50		50
20 mM NADH [мкл]		50	50		50
ADH <i>L.kefir</i> 5 Е/мл [мкл]			50		50
Ізопропанол [мкл]			50		50
50 mM Na-фосфат буферний розчин, pH 7.0 [мкл]	750	650	550	500	300

Загальний обсяг: 1 мл
Температура: 26±2°C
Магнітна мішалка: 200 обертів у хвилину

5 Тривалість: 15 годин.

Для деактивації ферментів всі проби нагрівали 15 хвилин до 95°C і центрифугували для підготовки для наступного аналізу HPLC (високопродуктивна рідинна хроматографія).

Аналіз HPLC:

Колона SUGAR SP0810+попередня колона SUGAR SP-G

10 Детектор: детектор показника переломлення

Елюент: дейонізована H₂O

Потік: 0,75 мл/хв

Кількість зразка: 10 мкл

HPLC точність кількісного вираження: ±10%

15 Час утримання:

Ксилоза: 13,97 хв

Ксилітол: 37,73 хв

Ізопропанол: 16,69 хв

Ацетон: 16,54 хв

20 Результати:

Концентрацію субстрату зразка №049 визначали за допомогою HPLC і вона склала 0,9 мг/мл.

25 Реакційна суміш №050 містила тільки ксилоредуктазу (0,1 Е/мл) і NADH (1 мМ). Після 15 годин продовження реакції було витрачено 0,085 мг ксилози. Концентрація ксилітолу перебувала нижче порога визначення.

Реакція №052 порівнянна з реакцією №050, однак з тією відмінністю, що в цьому випадку застосовували систему регенерації. Внаслідок чого відбувалося повне перетворення ксилози. Використовувані концентрації: XR (0,1 Е/мл), NADH (1 мМ), ADH (0,25 Е/мл) і ізопропанол (5%).

30 Концентрація ксилози в зразку №053 була визначена як 2,121 мг/мл, що відповідає очікуваній концентрації ксилози.

Реакція №054 порівнянна з реакцією №052, однак початкова концентрація ксилози була у два рази більше (50% субстрату в реакції). Концентрацію отриманого ксилітолу визначили як 0,945 мг ксилітолу. Використовувані концентрації: XR (0,1 Е/мл), NADH (1 мМ), ADH (0,25 Е/мл) і ізопропанол (5%).

35 У таблиці 2 представлені загальні результати реакцій засновані на даних вимірів HPLC (використана ксилоза й отриманий ксилітол; u.D.L. означає "нижче порога визначення"):

Таблиця 2

Номер реакції	049	050	052	053	054
Ксилоза перед реакцією [мг/мл]	0,9	0,815	0,8	2,121	1,945
Ксилоза після реакції [мг/мл]	-	0,815	u.D.L.	-	1,013
Ксилоза, використання в реакції [мг/мл]	-	u.D.L.		-	0,932
Одержаний ксилітол [мг/мл]	-	u.D.L.	0,994	-	0,945
Вихід ксилітола по відношенню до концентрації ксилози [%]	-	u.D.L.	100	-	47,9

Приклад 4

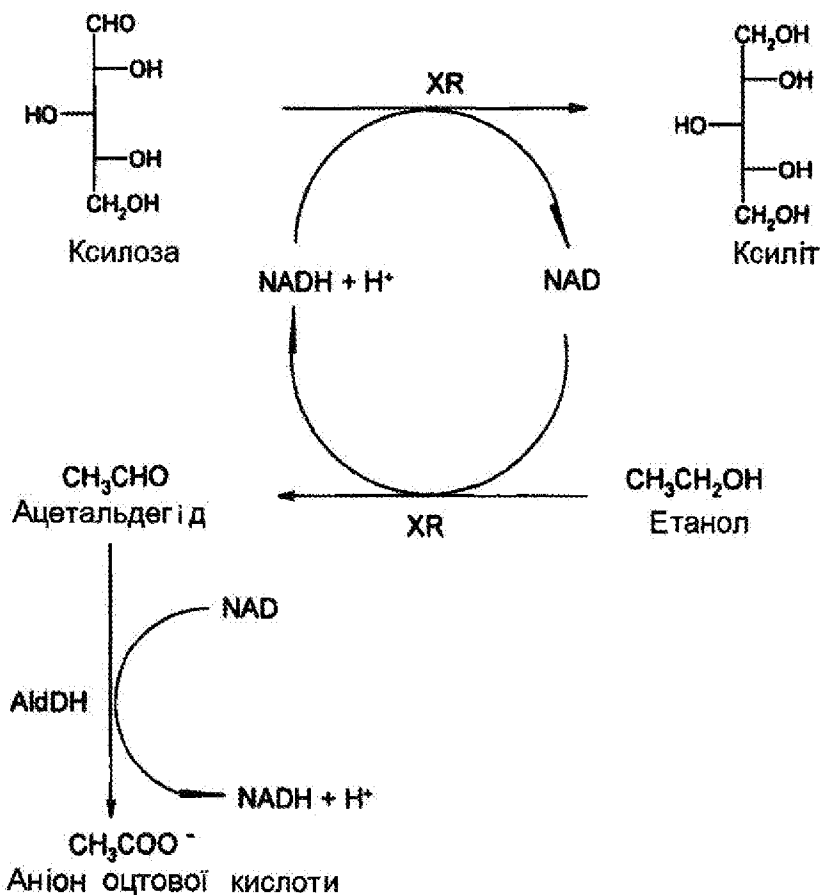
40 Ферментативний ксилітол одержували з розчину ксилози, що була отримана із соломи відповідно до способу, описаному в прикладі 2. У якості косубстрату використали етанол.

Обсяг розчину субстрату (порівняльний приклад 2) за допомогою ротаційного випарника зменшили до 50% для того, щоб підвищити концентрацію ксилози (~10 мг/мл ксилози).

45 Відновлення окисленого кофактора відбувалося за допомогою дії доданої ксилоредуктази (XR) з *Candida tenuis* і додатково дією доданої альдегідодегідрогенази з *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich: Katalognummer A6338; (EC) Number: 1.2.1.5; CAS Number: 9028-88-0). При цьому мова йде як про об'єднані субстрати, так і про об'єднану реакцію ферментів. У якості косубстрату використали етанол. Етанол й NAD⁺ на першій стадії під дією XR перетворювалися в NADH й ацетальдегід. На другій стадії ацетальдегід й NAD⁺ під дією альдегідодегідрогенази (AldDH) перетворювалися в ацетат (див. Sigma-Aldrich: Katalognummer A6338; або "Characterization and Potential Roles of Cytosolic and Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenases in Ethanol Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*", Wang et al., Molecular Cloning, 1998, Journal of

Bacteriology, p. 822-830). На один моль прореагировавшего косубстрату в цьому випадку повинні утворюватися 2 моль відновлювальних еквівалента (NADH) (див. схему реакції 2).

СХЕМА РЕАКЦІЇ 2



У таблиці 3 представлені реакційні співвідношення 4 різних дослідних реакцій 247, 249, 250 й 253. Використовували різні концентрації етанолу й AldDH. Концентрації кофактора й субстрату були постійними.

Таблиця 3

Номер реакції	247	249	250	253
Зразок субстрата III [мкл]	300 (56 мМ)	300 (56 мМ)	300 (56 мМ)	300 (56 мМ)
XR <i>C. tenuis</i> 5 Е/мл [мкл]	25 (0,25 Е/мл)	25 (0,25 Е/мл)	25 (0,25 Е/мл)	25 (0,25 Е/мл)
20 NAD ⁺ [мкл]	10 (0,4 мМ)	10 (0,4 мМ)	10 (0,4 мМ)	10 (0,4 мМ)
AldDH <i>S. cerevisiae</i> 5 Е/мл [мкл]	25 (0,25 Е/мл)	25 (0,25 Е/мл)	0	0
Етанол 50% [мкл]	75 (1286 мМ)	70 (1200 мМ)	75 (1286 мМ)	70 (1200 мМ)
50 мМ TrisHCl	65	70	90	95
Буферний розчин pH 7.0 [мкл]				

Загальний обсяг: 0,5 мл

температура: 25±2°C

Термомішалка: 500 обертів у хв.

Тривалість: 112 годин

Для деактивації ферментів всі проби нагрівали 15 хвилин до 70°C, потім центрифугували й фільтрували (PVDF; 0,2 мкм) для підготовки для наступного аналізу HPLC (високопродуктивна рідинна хроматографія).

Аналіз HPLC:

Колона SUGAR SP0810+попередня колона SUGAR SP-G

Температура колони 90°C.

Детектор: детектор показника переломлення

Элюент: дейонізована H_2O

Потік: 0,90 мл/хв

Кількість зразка: 10 мкл

5 HPLC точність кількісного вираження: $\pm 10\%$

Результати:

Максимального виходу продукту (реакція 249) досягали при концентрації етанолу 1,2 моль/л. При цьому всього було отримано 1,38 мг/мл ксилітолу, що відповідає виходу ксилітолу 21,2% від теоретичного.

10 У таблиці 4 об'єднані результати реакцій не основі даних вимірів HPLC.

Таблиця 4

Номер реакції	247	249	250	253
Теоретична загальна концентрація [мг/мл]	6,288	6,407	6,268	6,150
Ксилоза після реакції [мг/мл]	5,057	5,046	5,385	5,365
Ксилоза, використана в реакції [мг/мл]	1,231	1,361	0,883	0,785
Одержаний Ксилітол [мг/мл]	1,248	1,379	0,894	0,796

3 результатів очевидно, що етанол можна застосовувати як косубстрат. Як видно з порівняння реакції 249 (реакційна суміш містить AldDH) і 253 (реакційна суміш без AldDH),
 15 однозначно добавка альдегіддегідрогенази приводить до явного підвищення виходу ксилітолу. Відмінність кількості ксилози, перетвореної в ксилітол, становить $\sim 8\%$. Цей результат у сполученні з вищезгаданими літературними цитатами дозволяє зробити висновок про те, що утворюється з AldDH у першій частині відновлення ацетальдегід далі окислюється до оцтової
 20 кислоти (див. схема реакції 2). Дана енергетично сприятлива реакція й разом з нею підвищення, що відбувається, концентрації NADH зрушують рівновагу від вихідних речовин у напрямку продукту реакції - ксилітолу в першій частині реакції.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 25 1. Спосіб одержання продуктів розщеплення вуглеводів, який передбачає
 - обробку лігноцелюлозного матеріалу водним розчином, що містить спирт і має значення pH від 11,0 до 14,0 при температурі між 40 °C і менше 100 °C, розщеплення лігноцелюлози й відділення продуктів розщеплення від матеріалу, при цьому одержують збагачений целюлозою й геміцелюлозою матеріал, і
 30 - обробку отриманого збагаченого целюлозою й геміцелюлозою матеріалу щонайменше одним ферментом, що розщеплює вуглеводи, для того, щоб одержати продукти розщеплення вуглеводів,
 - за умови, що таку обробку здійснюють при температурі, іншій ніж 60 °C.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що водний розчин має значення pH від 11,0 до 13,0.
- 35 3. Спосіб за одним із пп. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що як лігноцелюлозний матеріал використовують соломку, багассу, енергетичні злаки й/або лузгу.
4. Спосіб за будь-яким із пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що лігноцелюлозні матеріали у водному розчині знаходяться у концентрації 5-40 мас. %.
5. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що спиртом є C_{1-4} спирт або фенол.
- 40 6. Спосіб за будь-яким із пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що продуктами розщеплення вуглеводів є цукри.
7. Спосіб за будь-яким із пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що збагачені целюлозою й геміцелюлозою матеріали обробляють ксиланазою й/або целюлазою для того, щоб одержати цукор.
- 45 8. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що отриманий цукор зброджують у спирт, який потім відокремлюють і відділяють.
9. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що підготовлену тверду речовину піддають взаємодії із ксиланазою, і отриману рідку фазу перетворюють в ксилітол, і тверду речовину, що залишилась,
- 50 - далі піддають взаємодії із целюлазою з утворенням різних продуктів ферментації; або
 - піддають термічному або термохімічному перетворенню; або
 - піддають мікробіологічному перетворенню з бактеріями, дріжджами або грибами;
 або

- піддають подальшій стадії делігнофікування з метою одержання целюлозно-волокнистих матеріалів.

10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що підготовлену тверду речовину піддають взаємодії із ксиланазою й отриману рідку фазу за допомогою ксилозодегідрогенази перетворюють в ксилітол, і тверду речовину, що залишилась,

- далі піддають взаємодії із целюлазою з утворенням різних продуктів ферментації; або

- піддають термічному або термохімічному перетворенню; або

- піддають мікробіологічному перетворенню з бактеріями, дріжджами або грибами;
або

10 - піддають подальшій стадії делігнофікування з метою одержання целюлозно-волокнистих матеріалів.

11. Спосіб за будь-яким із пп. 9 або 10, який **відрізняється** тим, що після відділення продуктів ферментації тверду речовину, що залишилась, ферментують в установці для одержання біогазу й далі переробляють у біогаз.

15

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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