

**(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)**

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
19 апреля 2012 (19.04.2012)



РСТ



(10) Номер международной публикации

WO 2012/049531 A1

(51) Международная патентная классификация:
C12P 7/10 (2006.01) *C13K 1/02* (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)

(21) Номер международной заявки: РСТ/ІВ2010/003408

(22) Дата международной подачи:
12 октября 2010 (12.10.2010)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме US): АРТЕР ТЕКНОЛОДЖИ ЛИМИТЕД (ARTER TECHNOLOGY LIMITED) [GB/GB]; Мэннор Плейс Сан Петер Порт Гернси, GY1 4EW, Гернси (GB).

(72) Изобретатели; и

(75) Изобретатели/Заявители (только для US):
КОРОЛЕВ, Кирилл Георгиевич (KOROLEV, Kirill Georgievich) [RU/RU]; ул. Жемчужная, 18-11 Новосибирск, 630090, Новосибирск (RU).
ЛОМОВСКИЙ, Олег Иванович (LOMOVSKY, Oleg Ivanovich) [RU/RU]; проспект академика Коптюга, 5-33 Новосибирск, 630090, Novosibirsk (RU).
ПОЛИТОВ, Анатолий Александрович (POLITOV, Anatoly Aleksandrovich) [RU/RU]; ул. Лесосечная б

5-147 Новосибирск, 630060, Novosibirsk (RU).
ГОЛЯЗИМОВА (БЕРШАК), Ольга Викторовна (GOLYAZIMOVA (BERSHAK), Olga Viktorovna) [RU/RU]; ул. Ученых, 8-106 Новосибирск, 630090, Novosibirsk (RU). БЫЧКОВ, Алексей Леонидович (BYCHKOV, Aleksei Leonidovich) [RU/RU]; ул. Октябрьская, 16 Садовое Котовский р-н Курганская обл., 641325, Sadovoe (RU).

(74) Агент: КУРЫШЕВ, Владимир Васильевич (KURYSHEV, Vladimir Vasilevich); а/я 33 Москва, 121087, Moscow (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW,

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING SUGARS BY ENZYMIC HYDROLYSIS OF PRETREATED EFB OIL PALM WASTE

(54) Название изобретения : СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ САХАРОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ ГИДРОЛИЗОМ ОБРАБОТАННЫХ ПУСТЫХ ФРУКТОВЫХ ГРОЗДЕЙ-ОТХОДОВ МАСЛИЧНОЙ ПАЛЬМЫ

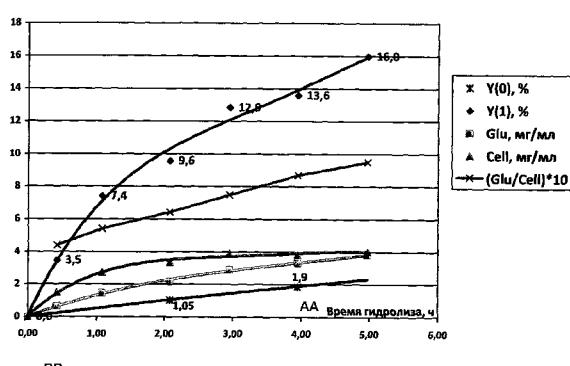


Рис. 9. Результаты гидролиза механически активированной биомассы. Условия гидролиза: гидромодуль - 8,3, концентрация комплекса 5,0 мг/мл (116 л/г), буфер цитратный с pH = 5,6, стабилизатор - 0,2 % раствор Tween-20, консервант - 0,1 % формалин. Концентрации целлюлозы (Cell), глюкозы (Glu), общий выход водорастворимых углеводов (Y), где (0) – активированная биомасса, (1) – активированная биомасса, из которой предварительно удалили липиды, водорастворимые вещества, большую часть биогенного кремния.

AA Hydrolysis time (hours)

BB Fig. 9. Hydrolysis results for mechanically activated biomass. Hydrolysis conditions: hydromodule - 8,3, complex concentration 5,0 mg/ml (116 l/g), citrate buffer pH 5,6, stabilizer - 0,2 % Tween-20 Solution, preservative - 0,1 % formalin. Concentrations of cellulose (Cell) and glucose (Glu), total yield of water-soluble carbohydrates (Y), where (0) is activated biomass and (1) is activated biomass from which lipids, water-soluble substances and the majority of biogenic silica has been previously removed.

углеводов с целью конверсии последних в этанол или другие

(57) Abstract: The invention relates to a process for preparing pretreated EFB oil palm waste for enzymatic hydrolysis and makes it possible to enhance the enzymatic hydrolysis of polysaccharides in the waste into soluble sugars. The method is intended for producing solutions of carbohydrates for the purpose of converting same into ethanol or other products of microbiological synthesis by further saccharification and combined fermentation. Empty Fruit Bunches, a waste product of oil palm (*Elaeis guineensis*) which is usually left after the production of palm oil, are preferably used as the initial feedstock. The method is based on eliminating the interfering influence of biogenic silicon dioxide and polyphenols and also gradually enhancing the reactivity of the polysaccharides in the raw material by alternating mechanical activation and enzymatic hydrolysis.

(57) Реферат: Данное изобретение касается способа подготовки отходов переработки гроздей масличной пальмы к ферментативному гидролизу и позволяет ускорить ферментативный гидролиз полисахаридов отходов в растворимые углеводы. Способ предназначен для получения растворов

[продолжение на следующей странице]



GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL,
PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Опубликована:

— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

продукты микробиологического синтеза методом последующего осахаривания и совместного сбраживания. В качестве сырья предпочтительно используются пустые фруктовые грозди (Empty fruit bunches) — отходы масличной пальмы (*Elaeis guineensis*), которые образуются при производстве пальмового масла. В основе способа лежит устранение мешающего влияния биогенного диоксида кремния и полифенолов в сочетании со ступенчатым повышением реакционной способности полисахаридов сырья путем чередования механической активации и ферментативного гидролиза.

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ САХАРОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ ГИДРОЛИЗОМ ОБРАБОТАННЫХ ПУСТЫХ ФРУКТОВЫХ ГРОЗДЕЙ-ОТХОДОВ МАСЛИЧНОЙ ПАЛЬМЫ

Область техники

Данное изобретение представляет собой способ подготовки отходов переработки гроздей масличной пальмы к ферментативному гидролизу и позволяет ускорить ферментативный гидролиз полисахаридов отходов в растворимые углеводы. Способ предназначен для получения растворов углеводов с целью конверсии последних в этанол или другие продукты микробиологического синтеза методом последующего осахаривания и совместного сбраживания. В качестве сырья предпочтительно используются пустые фруктовые грозди (Empty fruit bunches) – отходы масличной пальмы (*Elaeis guineensis*), которые образуются при производстве пальмового масла. В основе способа лежит устранение мешающего влияния биогенного диоксида кремния и полифенолов в сочетании со ступенчатым повышением реакционной способности полисахаридов сырья путем чередования механической активации и ферментативного гидролиза.

Предшествующий уровень техники

Этанол относят к наиболее современному виду биовозобновляемого топлива, он является потенциальным топливом «устойчивого развития» /Jeewon Lee, Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, *J. Biotech.*, 56 (1997) 1-24; Y. Sun, J. Cheng, Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review, *Bioresource Technology*, 83 (2007) 1-11/. Обычно его производство основано на микробиологическом сбраживании углеводов, главным образом глюкозы. Предложено много способов ферментации других распространенных углеводов, например ксилозы /T.W. Jeffries, Y.-S. Jin, Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63 (2004) 495-509/.

Альтернативой дефицитным источникам сбраживаемых углеводов, пищевому сырью (крахмалу, пшенице, кукурузе, сахарозе), является лигноцеллюлозное сырье: древесина, солома злаковых и кормовых культур и др. Основные проблемы конверсии такого сырья в биоэтанол и в другие технологически значимые продукты микробиологического синтеза связаны с низкой реакционной способностью целлюлозы и сопутствующих ей полимеров.

- 2 -

Применение методов, основанных на химической конверсии лигноцеллюлозы в сбраживаемые углеводы, ограничиваются высокой стоимостью кислотостойкого оборудования и отсутствием возможности эффективно утилизировать остатки биомассы. Например, применение серной кислоты ограничивает использование лигнина, возникают проблемы экологического характера при его сжигании.

Методы, основанные на ферментативном гидролизе полисахаридов лигноцеллюлозы, требуют применения эффективных способов повышения реакционной способности исходного сырья. Наибольшее распространение получили комбинированные методы, сочетающие химическую и механическую обработку. Обычно сначала удаляется существенная часть гемицеллюлозы, в ряде случаев и лигнина. Продукты частичного кислотного гидролиза используют для получения ксилозы, ксилита, сопутствующих коммерческих продуктов. Промежуточный продукт, обогащенный целлюлозой, подвергают механической активации и последующему ферментативному гидролизу с получением глюкозы. Комбинированные методы и методы прямого ферментативного гидролиза часто сталкиваются с проблемой инактивации ферментативных комплексов, используемых для осахаривания, побочными продуктами кислотного гидролиза, неуглеводными компонентами сырья /J.P. Delegnes, R. Moletta, J.M. Navarro, Effect of lignocelluloses degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*, *Enz. Microb. Tech.*, 19 (1996) 220-225/.

Одним из ключевых вопросов получения лигноцеллюлозного этанола из биовозобновляемых источников является выявление наиболее доступных и технологически удобных источников сырья. При этом необходимо рассматривать такие параметры как локализация сырья, урожайность, стоимость, сезонная продуктивность культуры, возможность эффективной транспортировки и локальной концентрации запасов сырья, содержание углеводов, степень готовности сырья к микробиологическим превращениям, получение ценных сопутствующих технологических продуктов.

Только производства, связанные с получением пальмового масла в Малайзии образуют 90 млн. тонн отхода – лигноцеллюлозной биомассы. 40 млн. тонн в год приходится на невостребованный отход – пустые фруктовые грозди.

Вырабатываемая из масличной пальмы продукция составляет только 10 % перерабатываемой биомассы. Остальные 90 % сырья, представляющего собой ценный для биохимической переработки лигноцеллюлозный материал, до сих пор не нашли экономически эффективного промышленного применения. Утилизация биомассы на

- 3 -

плантациях ограничивается закапыванием отходов в траншеи в местах их накопления с целью обогащения грунта органическим компонентом, продуктом микробиологического распада биомассы. Однако огромный избыток ежегодно возобновляемой биомассы значительно превышает научно-обоснованный объем органических удобрений, необходимых для эффективного функционирования пальмовых плантаций. Это отрицательно влияет на себестоимость выращивания масличной пальмы /Research and Development of Oil Palm Biomass Utilization in Wood-based Industries. Palm Oil Developments, MPOB, 36 (2002) 1-5/. Принимая во внимание данные литературы можно заключить, что указанные отходы являются наиболее доступным и технологически удобным источником лигноцеллюлозы, которая может использоваться для производства биоэтанола в данном регионе.

Задачей настоящего изобретения является поиск технического решения, позволяющего осуществлять эффективную биотехнологическую конверсию отходов в растворимые углеводы, пригодные для сбраживания в этанол или другие продукты микробиологического синтеза. Поставленная задача решается путём использования специфических особенностей отходов, что позволяет осуществлять эффективную механическую активацию сырья и его осахаривание.

Ниже рассмотрены подходы, используемые для конверсии лигноцеллюлозного сырья в растворимые углеводы. Приводятся данные по содержанию полисахаридов в пустых фруктовых гроздях масличной пальмы, методы конверсии данного сырья в биоэтанол.

Для предварительной обработки во всех способах используется энергия в виде пара, механической энергии, энергии излучения. Для увеличения скорости гидролиза и степени гидролиза применяют один или несколько видов предварительной обработки. Предварительная обработка увеличивает доступность и площадь поверхности гидролизуемых полисахаридов, нарушает физическую и молекулярную структуру исходного материала и приводит к разделению (резкому уменьшению межмолекулярных взаимодействий между макроструктурными элементами) лигноцеллюлозных материалов на лигнин, гемицеллюлозу и целлюлозу компоненты. При использовании дополнительных химических реагентов на стадии предварительной обработки требуется их удаление из конечного продукта.

Примеры общепринятых способов предварительной обработки включены в обзор /Sinitsyn A.P., Gusakov A.V., Chernoglazov V.M. Bioconversion of lignocellulose materials/ Moscow: Publishing House of Moscow State University, 1995, 220 p., and references in the list/:

- 4 -

- растворение лигнина химическими реагентами, такими как едкие щелочи, аммиак, хлорит, диоксид серы, амиды, разбавленные и концентрированные кислоты, и т. д. широко используемое в производстве пульпы и бумаги;
- обработка паром, паровзрывная обработка (steam explosion, мощная экструзия паром, то есть подача сырья давлением пара и разрушение сырья в результате резкого перепада давления при прохождении через выходное отверстие);
- автогидролиз высокотемпературным паром (220-270 °C);
- механическая обработка – измельчение и рассев;
- микроволновое облучение;
- ультразвуковое облучение;
- облучение электронами;
- гамма облучение.

Здесь рассмотрены наиболее близкие технические решения, использующие в том или ином виде ферментативную обработку. Также приводятся примеры, включающие механическую активацию лигноцеллюлозного сырья.

Большинство исследователей отмечают зависимость между степенью кристалличности целлюлозы и скоростью ее гидролиза. Чем более аморфизована целлюлоза, тем больше скорость гидролиза. В ряде случаев увеличение содержания аморфной фазы с 20 процентов до 80 приводит к увеличению скорости гидролиза в 5-6 раз. Кристаллическая целлюлоза биомассы может быть аморфизована путем механической обработки сырья в аппаратах различной конструкции – экструдерах, шаровых, виброцентробежных, струйных, валковых мельницах и др.

Ферментативный гидролиз биомассы, содержащей целлюлозу, протекает в гетерогенной среде, поэтому влияние площади границы раздела фаз на скорость гидролиза является значительным. В этой связи при предварительной обработке сырья по возможности стараются достичь низкого значения среднего размера частиц и обеспечить максимальное увеличение поверхности раздела фаз.

Для получения мелкодисперсного продукта растительное сырье, содержащее целлюлозу, подвергают механическому измельчению на различных типах мельниц, полученный продукт подвергают сушке и рассеву. Так, способ получения растительной муки /Emil H. Balz, Andrew W. Kassay, 1944, US 2362528, B27L 11/06/ включает

- 5 -

измельчение сырья на барабанной ударной мельнице, отделение мелких частиц и повторное измельчение на роторной мельнице оставшейся части сырья.

Способ, предложенный Н.С. Ениколоповым и др., заключается в том, что сырье перед измельчением увлажняют, затем измельчают в шнековом смесителе, нагретом до 120 °C, при давлении до 50 МПа /SU 4260749, 1988 г., D21B 1/06/. Для разрушения кристаллической структуры целлюлозы и увеличения удельной поверхности сырья с целью интенсификации последующего ферментативного гидролиза полисахаридов предложено обрабатывать отходы в двухшнековых экструдерах при повышенной температуре (до 200 °C). В качестве сырья могут быть использованы рисовая дробина, хлопковый линт, стебли хлопчатника /В.С. Орлова, RU 2223327, 2004 г., C13K 1/02/. G.R. Huber с соавторами также предложил проводить обработку содержащего целлюлозу сырья в экструдерах при повышенных температуре и давлении /G.R. Huber, и др., 1992, US 5114488, B30B 11/22, C13K 1/00/.

Известен метод обработки волокнистой лигноцеллюлозной биомассы для последующего гидролиза. Метод основан на обработке пульпы в микрокавитационных установках, при этом за счет интенсивных сдвиговых нагрузок достигается нарушение структуры волокон лигноцеллюлозной биомассы и ускорение ферментативного гидролиза /Ernest D. Stuart et al, 1996, US 5498766, C12P 19/14/.

Недостатками перечисленных способов получения мелкодисперсных продуктов из растительного сырья являются большие затраты энергии на измельчение и сушку сырья, а также низкая эффективность измельчения. Снижение эффективности обусловлено волокнистой структурой растительного сырья, наличием сопутствующих целлюлозе компонентов, таких как лигнины, гемицеллюлозы, которые придают особую прочность природным материалам, содержащим целлюлозу. Поэтому были предложены различные способы получения мелкодисперсных продуктов из растительного сырья, включающие предварительное химическое воздействие на сырье и последующую механическую обработку.

Данные способы включают кислотный гидролиз целлюлозы и гемицеллюлоз, содержащихся в растительном сырье, щелочную обработку с целью удаления лигнинов, обработку различными растворителями.

В частности, предложен способ получения мелкодисперсных продуктов, основанный на обработке древесины или другого сырья, содержащего целлюлозу, раствором мочевины, последующей сушке и измельчении на шаровой мельнице /Andrew W. Kassay, и др., 1942 г, US 2364721, C08L 97/02/.

- 6 -

Предварительная обработка сырья, содержащего целлюлозу, может проводиться в экструдерах в присутствии растворов щелочей /T. Inoi et al, 1987, US 4642287, C12P 19/00, C13K 1/00/, при этом достигается увеличение эффективности последующего ферментативного гидролиза полисахаридов сырья.

J.M. Gould с соавторами предложил метод, комбинирующий физическую и химическую обработку, для повышения доступности лигноцеллюлозного сырья по отношению к перевариваемости микроорганизмами и животными. В частности, солому пшеницы подвергали предварительной обработке в молотковой мельнице, затем пропускали через экструдер в присутствии щелочного раствора перекиси водорода /John M. Gould et al, 1991, US 4997488, C13K 1/02/. Полученный продукт в частности предложено использовать в качестве источника углеводов, глюкозы для последующего сбраживания в этанол.

Предложены методы, включающие предварительный кислотный гидролиз гемицеллюлоз растительного сырья, последующее механическое измельчение твердого остатка или активацию его паровым взрывом /David L. Brink et al, 1996, US 5536325, C13K 1/02; 1997, US 5628830, C13K 1/02/.

Недостатками перечисленных способов предварительной обработки биомассы являются: использование химических реагентов, что ограничивает применение полученных полупродуктов, а также высокие производственные затраты на удаление растворителей, кислот. Применение растворов кислот требует использовать кислотостойкие сорта металла для измельчающего, сушильного, транспортирующего оборудования. Возникает необходимость удаления побочных продуктов кислотного гидролиза, способных ингибировать ферменты и микроорганизмы.

Наиболее близкими к настоящему изобретению способами являются следующие методы, предложенные N. Kabbashi et al и Y.H. Syafwina et al. Оба этих метода касаются подготовки сырья к ферментативному осахариванию его полисахаридов.

Предложен метод прямой биоконверсии биомассы фруктовых гроздей масличной пальмы путем гетерогенной микробиологической обработки /Nassereldeen A. Kabbashi, Md. Zahangir Alam, M. Fahrurrazi Tompong, Direct bioconversion of oil palm empty fruit bunches for bioethanol production by solid state bioconversion, IIUM Eng. J., 8:2 (2007) 1-12/. Суть метода сводится к обработке сырья смесью культур, способных продуцировать целлюлозолитические ферменты и сбраживать образующиеся углеводы в этанол. Поскольку метод не предусматривает интенсификации ферментативного гидролиза,

- 7 -

посредством аморфизации целлюлозы, авторами получены сравнительно невысокие выходы растворимых углеводов и этанола.

Y.H. Syafwina et al предложили проводить активацию данного вида лигноцеллюлозного сырья посредством обработки его грибами – возбудителями белой гнили. Достигалось частичное разрушение лигнина, и как следствие некоторое повышение реакционной способности полисахаридов сырья по отношению к ферментативному гидролизу /Syafwina*I, Yoichi Honda, Takashi Watanabe, Masaaki Kuwahara, Pre-treatment of oil palm empty fruit bunch by white-rot fungi for enzymatic saccharification, *Wood Research*, 89 (2002) 19-20/.

Анализ литературы показывает, что основой задачей, которую необходимо решать при конверсии лигноцеллюлозных материалов в растворимые углеводы является повышение реакционной способности полисахаридов сырья. С технологической точки зрения и с точки зрения рационального природопользования оптимальными представляются методы, которые сочетают:

- Существенное изменение морфологии лигноцеллюлозного сырья, снижение межмолекулярных взаимодействий между основными макроструктурными элементами сырья: – лигнином, гемицеллюлозой и целлюлозой. Как правило, такое изменение морфологии наблюдается при размере частиц продукта, сравнимом с размерами клеток исходного сырья;
- Диспергирование исходного сырья и увеличению реакционной поверхности, на которой может протекать ферментативный гидролиз полисахаридов при контакте продукта предварительной обработки с водными средами;
- Аморфизацию кристаллической целлюлозы, и как следствие ускорение ее последующего ферментативного гидролиза.
- Использование в качестве реагентов экологически безопасных ферментативных комплексов.

Желаемый технологический эффект, повышение реакционной способности полисахаридов сырья, достигается в настоящем изобретении путем сочетания упомянутых факторов. Отличительным признаками настоящего изобретения является учет специфики выбранного лигноцеллюлозного сырья, а также проведение механической активации с наименьшими затратами энергии.

Сыре предварительно подвергают обработке горячей водой с последующим отжимом на прессе. На этой стадии удаляется значительная часть водорастворимых

- 8 -

веществ и липидов, которые, как будет показано ниже, снижают активность ферментативного комплекса. Полученный полупродукт измельчают до размера частиц 0,5-2 мм, обрабатывают слабым раствором целлюлозолитического комплекса в присутствии поверхностно-активного вещества. Здесь достигается дополнительно удаление липидов и частичное разрушение надмолекулярных структур, образованных полисахаридами сырья, благодаря чему понижается его механическая прочность. Полученный полупродукт подвергают механической активации с последующей экстракцией горячей водой. На этой стадии удаляют растворимые полифенолы и большую часть биогенного диоксида кремния, компоненты, которые также снижают эффективность ферментативного комплекса. Осахаривание сырья осуществляют путем чередования механической активации твердого остатка и ферментативного гидролиза. При этом механическую обработку проводят до тех пор, пока сохраняется линейная зависимость между временем активации и скоростью гидролиза.

Химический состав биомассы (Empty fruit bunches, EFB)

Общие сведения

Биомасса растительных материалов состоит из пяти основных компонентов: целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина, белков и неорганических веществ. Целлюлоза, гемицеллюлоза и лигнин являются наиболее важными в производстве этанола.

Целлюлоза – линейный полисахарид, построенный из элементарных звеньев ангидро-D-глюкозы и представляющий собой поли- β -1,4-D-глюкопиранозил-D-глюкопиранозу. Макромолекула целлюлозы наряду с ангидроглюкозой может содержать остатки других моносахаридов (пентоз и гексоз), а также уроновых кислот. Характер и количество таких остатков определяется условиями биохимического синтеза. Степень полимеризации нативной целлюлозы может составлять более 10 тысяч мономерных единиц, для большинства травянистых растений степень полимеризации не превышает 1,5 тысяч единиц.

Целлюлоза – главная составляющая клеточных стенок высших растений. Вместе с сопровождающими ее веществами она играет роль каркаса, несущего основную механическую нагрузку.

Целлюлоза имеет сложную надмолекулярную структуру. Наименьшим надмолекулярным звеном целлюлозы является первичная фибрилла, в которой группы параллельно расположенных макромолекул связаны между собой множественными водородными связями. Макромолекулы целлюлозы в первичных фибриллах образуют высокоупорядоченные кристаллические зоны, которые чередуются с неоднородными менее упорядоченными аморфными зонами. Протяженность кристаллических зон в первичных фибриллах достигает 15 нм, поперечное сечение первичных фибрил составляет 3-7 нм.

Первичные фибриллы целлюлозы соединяются между собой с помощью водородных связей в микрофибриллы, которые и являются основными звеньями строения волокон целлюлозы. Согласно общепринятой в настоящее время модели Фрей-Висслинга существенную роль в формировании микрофибрилл играет окклюдированная вода и находящиеся между первичными фибриллами лигнин и гемицеллюлоза.

Такая специфичная организация морфологической структуры целлюлозы обеспечивает ее устойчивость при воздействии значительных механических нагрузок. Целлюлоза также весьма устойчива к действию кислот, ферментов и микроорганизмов. Природная целлюлоза представляет собой композиционный материал с кристаллической

- 10 -

матрицей и аморфными наполнителями, гемицеллюлозой и лигнином, которые играют роль адгезивов.

Сложность процесса конверсии лигноцеллюлозного сырья в биоэтанол заключается в том, чтобы превратить устойчивую целлюлозу в глюкозу, которая легко сбраживаются дрожжами в этанол.

Гемицеллюлозы – полисахариды, входящие в состав клеточной стенки растительной ткани наряду с целлюлозой и лигнином, представляют собой разветвленные полимеры различного строения. Основными мономерными единицами гемицеллюлоз являются галактоза, глюкоза, манноза, ксилоза, арабиноза, уроновые кислоты.

Гемицеллюлозы отличаются от целлюлозы лучшей растворимостью в щелочных растворах и способностью легче гидролизоваться растворами целлюлозолитических ферментов и слабыми растворами кислот. Степень полимеризации у гемицеллюлоз, как правило, ниже, чем у целлюлозы. Моносахаридные остатки обычно соединены β -1,4-связями, причем часто имеются боковые связи другого типа. Главным компонентом гемицеллюлоз является ксилоза (50-70 % мономерных звеньев).

Лигнины – аморфный поперечно сшитый фенольный полимер, который присутствует только у сосудистых растений, и может составлять 30 % от их массы. Лигнины не перерабатываются микроорганизмами, способными к образованию этанола, и не используются в производстве этанола. Остатки лигнина можно использовать в качестве топлива непосредственно на производстве, например для получения пара и генерации электроэнергии.

Биомасса растений состоит из целлюлозных макроволокон, покрытых слоем гемицеллюлоз. Эти слои погружены в матрицу лигнина. Диаметр целлюлозных макроволокон 1-4 мкм. Механическое разделение целлюлозы и лигнина может быть достигнуто при измельчении материала до размера частиц 1-4 мкм. Обработка растительных материалов до порошка такого размера с производительностью, приемлемой с промышленности точки зрения, связана с большими трудностями.

Таблица 1. Химический состав биомассы.

Компонент	Содержание, % от сухого сырья	Компонент	Содержание, % от сухого сырья
Экстрактивные вещества	$3,7 \pm 0,3$	Ксилоза	$33,1 \pm 2,6$
Нерастворимый в кислоте лигнин	$18,8 \pm 0,3$	Манноза	$1,3 \pm 0,01$
Беззольный	$17,8 \pm 0,2$	Галактоза	$1,0 \pm 0,0$

- 11 -

кислоторастворимый лигнин			
Зола	$1,3 \pm 0,2$	Глюкоза	$66,4 \pm 3,7$
Растворимые в горячей воде	$7,5 \pm 0,8$	Растворимые в 1 % NaOH	$14,5 \pm 2,7$
Холоцеллюлоза	$82,4 \pm 1,4$	Целлюлоза	$62,9 \pm 2,0$
Гемицеллюлоза	28,0	Арабиноза	$2,5 \pm 1,1$

Химический состав пустых фруктовых грядей масличной пальмы представлен в таблице 1 / K-N. Law, W.R.W. Daud, A. Ghazali, Morphological and chemical nature of fibre strands of oil palm empty-fruit-bunch (OPEFB, *BioResources*, 2:3 (2007) 351-362/. Видно, что общее содержание целлюлозы и гемицеллюлозы в данной биомассе более 80 %, а содержание лигнина – около 18 %. По сравнению с соломой злаковых и кормовых культур, где содержание целлюлозы не превышает 60 %, а содержание лигнина достигает 35 %, данный вид лигноцеллюлозного сырья имеет явное преимущество.

По сравнению с другими видами растительного сырья: древесиной, стеблями злаковых растений, биомасса EFB имеет следующие отличия, которые необходимо учитывать в технологии переработки и подготовки к ферментативному гидролизу:

- Сырьё отличается повышенной концентрацией липидов и водорастворимых веществ,
- Сырьё состоит из сосудистых клеток длиной 0,5-1,2 мкм с диаметром 10 мкм и толщиной стенок 2-3 мкм, содержащими между собой надмолекулярные структуры, образованные гемицеллюлозой и лигнином,
- Внутренний объём сосудистых клеток соединён и распространяется по всей длине волокна (фибриллы),
- В стенках сосудистых клеток существуют каналы, ведущие из внутреннего объёма наружу, которые в исходном виде закрыты частицами аморфного кремнезёма,
- Стенки сосудистых клеток состоят из целлюлозы и лигнина, содержание последнего меньше, чем среднее содержание лигнина в сырье.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Механическая активация и механохимическая обработка

В настоящее время нет общей теории описывающей механохимические реакции / M.K. Beyer, H. Clausen-Schaumann, *Mechanochemistry: the mechanical activation of covalent bond*, *Chem. Rev.*, 105:8 (2005) 2921-2948/. Рассматриваются отдельные аспекты и возможные явления:

- образование активных поверхностных радикалов,
- роль межфазовых процессов /P.Yu. Butyagin, The role of interphases in low temperature reactions of mechanochemical synthesis, *Russ. Colloidal J.*, 59:4 (1997) 460-467/,
- гидротермальные химические процессы при механической активации гетерогенных систем, содержащих воду (в результате стесненного удара на контакте частиц возникают условия «автоклавирования», которые характеризуются высокими температурами и давлением) /V.V. Boldyrev, Hydrothermal reactions under mechanochemical action, *Powder Technol.*, 122 (2002) 247-254/.

С технической точки зрения механическая активация признана одним из эффективных методов изменения физико-химических свойств твердых фаз. Под механической активацией понимают увеличение реакционной способности, обусловленное устойчивыми изменениями структуры вещества под действием механических нагрузок. (Авакумов Е.Г. Механические методы активации химических процессов. Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1986, 303 с.).

Приложенное к твердому телу механическое напряжение может релаксировать по нескольким каналам. Механическая энергия расходуется, главным образом, на образование новой поверхности и дефектов кристаллической структуры. Эти процессы приводят к увеличению свободной энергии твердого тела, в результате чего повышается его реакционная способность. Так, механически активированные твердые фазы характеризуются повышенными, по сравнению с неактивированными фазами, скоростями растворения и легче вступают в химические реакции с газами и жидкостями.

Основные физико-химические последствия механической активации твердых веществ заключаются в повышении их реакционной способности, с практической точки зрения интерес представляют:

- 13 -

- Увеличение поверхности и связанные с этим размерные эффекты;
- Разупорядочение кристаллической структуры и аморфизация;
- Получение гетерогенных систем с развитой границей раздела фаз, на которой наблюдаются существенные изменения физико-химических характеристик вещества (свободной энергии, кристаллической структуры и др.).

Применительно к гетерогенным системам, которые имеют сложный фазовый состав и состоят из множества компонентов, используют более общий термин «механохимическая обработка». Механохимическая обработка, как и механическая активация, приводит к устойчивым изменениям физико-химических свойств системы. Повышение реакционной способности, как правило, затрагивает большинство фаз и компонентов системы. При механохимической обработке могут протекать химические реакции, которые являются следствием увеличения подвижности компонентов и их свободной энергии под действием механических нагрузок /V.V. Boldyrev, *Mechanochemistry and mechanical activation, Materials Sci. Forum*, 225-227 (1996) 511-520/.

Механическая активация и следующий за ней химический процесс с участием жидкой фазы, например гидролиз, экстракция, химическое взаимодействие твердых компонентов вследствие полного или частичного растворения в жидкой фазе, могут быть совмещены. Показано, что при механической обработке системы твердое тело – жидкость наблюдаются инициирование и ускорение различных химических превращений. Протеканию таких химических реакций способствуют явления, характерные для активации смесей твердых компонентов (увеличение границы раздела фаз, накопление дефектов, аморфизация, повышение свободной энергии).

Известны физические явления, которые осуществляются при механохимическом воздействии на систему твердое вещество – жидкость. Интенсивное перемешивание, распределение частиц твердого вещества в целлюлозных гелях увеличивает скорость диффузии компонентов системы. Диспергирование, эмульгирование несмешивающихся компонентов – другой эффект, характерный для механохимической обработки. Агломерация частиц в поле механических напряжений может являться следствием высокой скорости столкновений вследствие механического воздействия. Механическая обработка может создавать необычные условия для химических реакций. В жидких системах в локальных участках обрабатываемого объема создаются гидротермальные условия, наблюдаются кавитационные процессы.

- 14 -

С экономической точки зрения механическая энергия является «дорогостоящим» типом энергии. Использовать ее необходимо эффективно. В некоторых случаях механохимическая обработка твердой смеси может быть остановлена на ранней стадии превращения реагентов, а полное химическое превращение достигается в результате других, менее энергоемких процессов, как правило, с участием жидких фаз.

В случае такого подхода на стадии механохимической обработки достигается:

- Введение дефектов в кристаллическую структуру реагентов,
- Уменьшение степени кристалличности и аморфизация реагентов,
- К настоящему времени описано множество технологий, в которых используется механохимическая обработка, например:
 - Подготовка минерального сырья с целью увеличения выхода в процессах извлечения полезного компонента /Tkacova, K. Mechanical activation of minerals. – Amsterdam: Elsevier, 1989. – 156 pp./,
 - Интенсификация гидрометаллургических процессов /Balaz, P. Mechanicka activacia v procesoch extrakčnej metalurgie – Veda.: Bratislava (Slovakia), 1997. –223 pp./
 - Химическая переработка угля /Khrenkova, T.M. Mechanochemical activation of coals – Moscow: Nedra. – 176 pp./.

Перспективы развития механохимии связывают с катализом органических реакций /V.V. Molchanov, R.A. Buyanov, Mechanochemistry of catalysts, *Russ. Chem. Rev.*, 69 (2000) 476-493/, фармакологией / V.V. Boldyrev, Mechanochemical modification and synthesis of drugs, *J. Materials Science*, 39 (2004) 5117-5120) и решением экологических проблем /Lomovsky O.I., Boldyrev V.V. Mechanochemistry for solving environmental problems. Publ. SO RAN: Novosibirsk (Russia), 2006, 221 pp/.

Эффективность осуществления механохимических реакций зависит не только от химических свойств реагентов, но и от их механических свойств. Проведение механохимических процессов, в которых участвуют мягкие вещества и материалы, требует небольших затрат энергии /Avvakumov, E. M. Senna, M. Kosova. Soft mechanochemical synthesis: a basis for new chemical technologies/ Boston: Kluwer Academic Publishers, 2001. – 200 pp/. Твердость органических веществ обычно гораздо ниже, чем неорганических. Механохимические реакции, протекающие в органических системах, имеют в 1000 раз больший энергетический выход, чем в неорганических системах. Показано, что некоторые органические реакции более эффективно проводить в твердой фазе, нежели в жидкой фазе /K. Tanaka, F. Toda, Solvent-free organic synthesis, *Chem. Rev.*,

- 15 -

100 (2000) 1025-1074/. Таким образом, в плане технологического использования наиболее перспективными оказываются механохимические процессы, протекающие с участием органических веществ.

Одним из дополнительных преимуществ применения механической обработки в биотехнологиях является возможность одновременного разрушение клеточных мембран, на что в других вариантах технологии требуются дополнительные затраты тепловой энергии и реагентов.

Отличительным признаками настоящего изобретения является проведение механической активации с учетом специфики биомассы и с наименьшими затратами энергии:

- Сырье предварительно подвергают обработке горячей водой с последующим отжимом на прессе. На этой стадии удаляется значительная часть водорастворимых веществ и липидов, которые, как будет показано ниже, снижают активность ферментативного комплекса.
- Полученный полупродукт измельчают до размера частиц 0,04-2 мм, обрабатывают слабым раствором целлюлозолитического комплекса в присутствии поверхностно-активного вещества. Здесь достигается частичное разрушение надмолекулярных структур, образованных гемицеллюзой и лигнином, благодаря чему понижается его механическая прочность. После этой стадии сырье становится пригодным для механической активации в режиме стесненного удара.
- Полученный полупродукт подвергают механической активации в режиме стесненного удара с последующей экстракцией горячей водой. На этой стадии открываются внутренние объёмы сосудистых клеток и удаляются растворимые полифенолы и большую часть биогенного диоксида кремния, компоненты, которые также снижают эффективность ферментативного комплекса.
- Осахаривание сырья осуществляют путем чередования механической активации твердого остатка, состоящего из сосудистых клеток с открытым внутренним объёмом, и ферментативного гидролиза. Механическую обработку проводят до тех пор, пока сохраняется линейная зависимость между временем активации и выходом углеводов, который достигается при постоянной скорости гидролиза.

Факторы, влияющие на активность ферментативного комплекса

Для гетерогенного гидролиза скорость реакции пропорциональна площади контакта при условии постоянства концентрации катализатора. Ферментативный гидролиз использованной биомассы характеризуется заметным снижением скорости на начальных стадиях процесса, по сравнению с другим лигноцеллюлозным сырьем, например, с соломой злаковых культур. Наблюдаемое на начальном этапе снижение скоростей весьма существенно и не может быть объяснено расходом реагента в реакции гидролиза (уменьшением площади контакта).

Наиболее вероятными факторами, вызывающими отклонение от формальной кинетики, являются:

- Термическая инактивация компонентов ферментативного комплекса.
- Химическая инактивация ферментативного комплекса.
- Обратимый характер некоторых стадий процесса.
- Ступенчатый характер процесса (сочетание «быстрого» и «медленного» гидролиза, когда сначала быстро гидролизуется аморфный субстрат, а затем протекает гидролиз кристаллического субстрата).

Термическая инактивация ферментативного комплекса. Большинство ферментов стабильны в иммобилизованном, твердом или глубоко охлажденном состоянии. Многие ферменты теряют активность в растворах, особенно в отсутствии субстрата. Установлено, что активность ферментативного комплекса заметно снижается при его инкубировании в оптимальных условиях проведения гидролиза. Эти данные согласуются с данными производителя, согласно им в оптимальных условиях гидролиза ($\text{pH} = 4,5\text{--}4,7$, $T = 50,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$) ферментативный комплекс теряет в растворе в отсутствии субстрата 4-5 % общей активности в час. Это означает, что в течение суток активность комплекса уменьшается на 40-60 процентов. Таким образом, заметное снижение активности наблюдается за технологически приемлемые времена, сопоставимые со временем проведения процесса последующего осахаривания и совместного сбраживания.

В присутствии субстрата активность падает в меньшей степени по сравнению с растворами фермента без субстрата, поскольку последний способен иммобилизовать ферменты. С другой стороны, ферменты, имеющие слабое сродство к твердому субстрату, например экзоглюканазы и глюкозидазы, ответственные за расщепление олигосахаридов

- 17 -

до моносахаридов, могут инактивироваться вне зависимости от наличия субстрата. Инактивация этих ферментов приводит к накоплению промежуточных продуктов и снижению скорости реакции. Предложен способ устранения данного эффекта.

Меры по снижению скорости термической деградации ферментов позволяют увеличить скорость гидролиза и открывают дополнительные возможности в плане повторного использования первичных гидролизатов, например, в режиме противотока для получения концентрированных растворов углеводов.

Химическая инактивация ферментативного комплекса. Установлена корреляция между падением скорости гидролиза на начальном этапе гидролиза и содержанием в сырье водорастворимых веществ. Наблюдаемый эффект обусловлен наличием во фракции ВРВ компонентов, способных связывать ферменты комплекса. К таким компонентам относятся лигнин, пектиновые вещества, а также минеральные вещества.

В кислых и слабокислых растворах сравнительно легко протекает реакция образования прочных межмолекулярных комплексов между белками и полифенолами. На этом в частности основан процесс дубления или осветления соков /K.J. Siebert, N.V. Troukhanova, P.Y. Lynn, Nature of Polyphenol-Protein Interactions, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 80-85/. В случае ферментативного гидролиза некоторые компоненты растительного сырья, а именно растворимые полифенолы, растворимая часть лигнина, могут обратимо или необратимо связывать компоненты ферментативного комплекса.

При введении водорастворимых веществ или лигнина биомассы в модельные системы (фильтровальная бумага + ферментативный комплекс) наблюдали существенное снижение скорости гидролиза.

Механическая активация заметно нарушает строение природного лигноцеллюлозного композита, открывает доступ к целлюлозе. С другой стороны следует ожидать увеличения доступности лигнина. Имеют место два процесса: параллельная сорбция ферментов на лигнине и целлюлозе, а также перенос ферментов с целлюлозы на лигнин. В пользу этого свидетельствует увеличивающая разница в концентрации глюкозы для экспериментов с добавлением и без добавления лигнина. Равновесие субстрат-фермент устанавливается быстро, после чего лигнин «вытягивает» через раствор адсорбированные субстратом ферменты.

На основе полученных данных предложены следующие рекомендации. Поскольку водорастворимая часть растительного сырья не содержит экономически значимого количества углеводов, предлагается удалять водорастворимые компоненты на стадии подготовки сырья. С одной стороны это позволяет избежать частичной инактивации

- 18 -

ферментов. С другой стороны, удаление водорастворимых веществ значительно повышает эффективность механической обработки растительного сырья.

Введение добавок поверхностно-активных веществ способствует сохранению активности ферментативного комплекса. Благодаря этому снижается сорбция ферментов на лигнине, при этом количество доступного фермента повышается. В качестве ПАВ можно использовать TWEEN и низкомолекулярный полиэтиленоксид.

Существенное влияние на процесс гидролиза оказывает минеральная составляющая. Введение хлористого кальция на стадии механической обработки способствует тонкому измельчению, увеличению поверхности и снижению кристалличности. Поэтому введение хлористого кальция рекомендуется только для первой стадии процесса. Ионы некоторых металлов способны встраиваться в активные центры ферментов и менять активность фермента. К таким металлам относятся магний и кальций.

Обратимый характер некоторых стадий процесса (псевдоинактивация компонентов ферментативного комплекса продуктами гидролиза) и ступенчатый характер гидролиза. Для удобства последующего изложения, приводится схема /Sinitsyn A.P., Gusakov A.V., Chernoglazov V.M. Bioconversion of lignocellulose materials/ Moscow: Publishing House of Moscow State University, 1995, 220 p., and references in the list/, поясняющая стадии ферментативного гидролиза (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Полисахариды гидролизуются эндоглюканазами, действующими на внутренние гликозидные связи, (эндоцеллюлаза или 1,4-бета-D-глюкан-глюканогидролаза, техническое название этого фермента – эндо-1,4-бетаглюканаза, на схеме E_1), при этом преимущественно образуются «длинные» олигосахариды. Эндоглюканазы действуют на кристаллическую и аморфную целлюлозу, являются субстрат-специфичными ферментами, хорошо сорбируются на твердом субстрате.

Олигосахариды являются субстратом для экзоглюканаз, действующих на внешние, ближайшие к концу молекулы, связи. Основным продуктом реакции являются дисахариды. На схеме эта группа ферментов обозначена E_2 . наиболее значимым в этой группе ферментов является экзоцеллюлаза или 1,4-бета-D-глюкан-целлобиогидролаза, техническое название этого фермента – целлобиогидролаза, продукт ее действия на олигосахариды – дисахарид целлобиоза. Экзоглюканазы также являются специфичными ферментами.

Целлобиоза может быть гидролизована до двух молекул глюкозы под действием бета-глюказидазы или бета-D-глюказид-целлобиогидролазы, техническое название этого

- 19 -

фермента – целлобиаза, на схеме – E_3 . Считается, что промежуточный продукт целлобиоза способен обратимо инактивировать фермент предшествующей стадии – целлобиогидролазу.

Для глюкозидаз характерна широкая специфичность: они способны гидролизовать D-гликозидные связи между глюкозными и арильными, алкильными или углеводными остатками. Глюкозидазы могут гидролизовать 1-2, 1-3, -4 и 1-6 гликозидные связи. У многих бета-глюкозидаз отсутствует строгая специфичность к конфигурации гидроксильных групп у C-4 и C-5 атомов гексозидов и пентозидов. Отличительной особенностью бета-глюкозидаз является то, что они, в отличие от экзоглюкозидаз (на схеме E_4), быстрее действуют на короткие олигосахариды.

Экзоглюкозидазы отличаются от целлобиогидролаз тем, что основным продуктом их действия на поли- или олигосахаридные субстраты являются не ди-, а моносахариды. Экзоглюкозидазы способны гидролизовать аморфную целлюлозу.

Под ступенчатым характером гидролиза понимается следующее. Считается, что гидролиз целлюлозы протекает в две стадии. Первая стадия, быстрая, – гидролиз амофного субстрата, вторая стадия, медленная, – гидролиз кристаллического субстрата.

- 20 -

Предпочтительные варианты (осуществления изобретения)

ПРИМЕР 1. Термическая инактивация ферментативного комплекса.

Здесь и далее за одну единицу активности целлюлозолитического комплекса принимается способность гидролизовать бумагу Watman №1 при гидромодуле 20 и $T = 50^{\circ}\text{C}$ в течение часа с образованием 1 мг альдоз (восстанавливающих углеводов) в пересчете на глюкозу. Таким образом, активность является величиной, пропорциональной начальной скорости гидролиза целлюлозы в определенных условиях. Поскольку по ходу гидролиза скорость процесса падает, очевидно, что активность, измеренная в начальные времена, будет заметно выше активности, измеренной через несколько часов гидролиза, или средней активности, найденной за продолжительный гидролиз.

На **Ошибка! Источник ссылки не найден.** представлены данные по изменению активности ферментативного комплекса Целлолюкс (целлюлозолитический комплекс производства Сиббиfarm, Бердск, РФ) в растворе. Видно, что активность комплекса (по глюкозе и общая) в буферном растворе при оптимальной температуре снижается примерно на 4-5 % в час. Показано, что введение в реакционные среды поверхностно-активных веществ, например ТВИН-20 или ТВИН-80 в концентрации 0,1-0,2 % значительно повышает устойчивость растворов ферментов и позволяет использовать инкубированные 24 часа при 50°C растворы с эффективностью практически равной исходной (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Значительной стабилизации компонентов ферментативного целлюлозолитического комплекса можно добиться путем введения в реакционные среды полиэтиленоксида. Однако, отмечается снижение общей активности, которое обусловлено повышением вязкости растворов и возникновением дополнительных диффузационных ограничений.

ПРИМЕР 2. Химическая инактивация компонентов ферментативного комплекса водорастворимыми веществами и лигнином.

Водорастворимые вещества, выделенные из биомассы, инактивируют ферментативный комплекс в первый час гидролиза на 35-40 %. Так, введение водорастворимых веществ в начале гидролиза целлюлозы приводит к снижению активности, измеренной по глюкозе, с 370 до 190 единиц (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**).

В эксперименте измерялось накопление глюкозы при действии целлюлозолитического комплекса на бумагу в отсутствии лигнина, выделенного из

- 21 -

биомассы, и с его добавкой (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Введение мелкодисперсного порошка лигнина из расчета 10-15 % на субстрат приводило к снижению выхода глюкозы в первые несколько часов на 25 %.

ПРИМЕР 3. Химическая инактивация компонентов ферментативного комплекса водорастворимыми минералами.

Введение растворимых форм кальция в реакционные среды, включающие субстрат и ферментативный комплекс, заметно снижает скорость ферментативного гидролиза целлюлозы. На **Ошибка! Источник ссылки не найден.** представлены результаты измерения активности ферментативного комплекса при добавлении в реакционные среды хлорида кальция и щавелевокислого аммония, образующего нерастворимый осадок с хлоридом кальция. В качестве субстрата использовали биомассу, подвергнутую механической обработке с добавкой хлорида кальция (5 % по массе). Из растительного сырья были предварительно удалены липиды и водорастворимые вещества. Механически активированное сырье заливали раствором фермента, в отдельных вариантах в реакционную среду вводили необходимые добавки, реакторы помещали на 13 часов в термошайкер с температурой 50 °C, частой колебаний ~ 240 в минуту (*вариант 0*). Затем гидролизаты центрифугировали, 2/3 гидролизата, освобожденного от осадка, переносили на свежий субстрат, подготовленный аналогичным способом и взятый в количестве 2/3 от исходного (*вариант L*). К остатку добавляли цитратный буфер до достижения исходного объема (*вариант S*). Через 13 часов определяли содержание глюкозы в гидролизатах, на основе полученных данных находили активность комплекса. При расчете активности для вариантов *L* и *S* использовали исходную концентрацию комплекса.

Из левой диаграммы для опытов 2 и 3, что суммарная активность компонентов комплекса (*варианты L* и *S*), оказывается ниже исходной активности. Эффект снижения активности ферментативного комплекса наиболее выражен для опыта 2, в котором был добавлен хлористый кальций. Здесь потери составили примерно 50 % для первичного гидролиза в течение 13 часов (сравните *варианты 0* опытов 1 и 2), и примерно столько же для суммы вариантов *L* и *S*.

Снижение суммарной активности ферментативного комплекса объясняется инактивацией компонентов комплекса катионами кальция.

В опыте 3, когда кальций был связан в нерастворимую форму, сохранилось порядка 70 % исходной активности. Однако и здесь не удалось избежать заметной инактивации компонентов комплекса. Над осадком нерастворимого оксалата кальция, образующегося

- 22 -

при добавлении щавелевокислого аммония, имеется некоторая равновесная концентрация растворенного кальция. Кальций, находящийся в растворе, «связывает» ферменты. Снижение концентрации кальция компенсируется частичным растворением осадка до достижения равновесной концентрации. В результате наблюдается снижение активности компонентов комплекса, однако над осадком нерастворимой соли этот процесс протекает заметно медленнее.

Обращают на себя внимание результаты опыта 2, в котором активности в вариантах *S* и *L* примерно одинаковые. При высоком содержании кальция, практически полностью инактивируются ферменты, находящиеся в растворе. Вероятно, в основе инактивации лежит связывание кальция активным центром фермента. Для компонентов комплекса, сорбированных субстратом, следует ожидать меньшей доступности активного центра, поэтому эти ферменты при избытке кальция подвергаются инактивации в меньшей степени по сравнению с ферментами, находящимися в растворе.

Известно, что в первую очередь гидролизуется аморфная целлюлоза, а содержание аморфной целлюлозы в субстрате является величиной, отражающей реакционную способность субстрата по отношению к гидролизу. Меньшее значение суммы активностей вариантов *S* и *L* по сравнению с активностью, найденной в варианте *0*, объясняется снижением содержания аморфной фазы в системе.

Для опыта 4 отмечено заметное увеличение активности части ферментативного комплекса, оставшейся вместе с осадком после центрифугирования (сравните варианты *S* опытов 1 и 4). Введение щавелевокислого аммония в исходный субстрат связывает добавленный на стадии механической активации хлористый кальций и таким образом предотвращает инактивацию ферментов. Данный эффект более выражен для опытов 2 и 3. Здесь активность ферментов, оставшихся на осадке, возрастает примерно в два раза – с 18 до 35 единиц.

Представленные выше эксперименты свидетельствуют в пользу того, что инактивация компонентов ферментативного комплекса водорастворимыми веществами, выделенными из пальмовых гроздей, может быть обусловлена наличием в растворимой минеральной части солей щелочноземельных металлов. Представляется целесообразным перед ферментативным гидролизом удалять из растительного сырья растворимую минеральную составляющую.

ПРИМЕР 3. Ступенчатый характер процесса (сочетание «быстрого» и «медленного» гидролиза).

- 23 -

Обращаясь к приведенным на **Ошибка! Источник ссылки не найден.** схеме ферментативного гидролиза и данным, приведенным на **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, можно сделать вывод о глубоком изменении субстрата по ходу ферментативного гидролиза.

Часть компонентов ферментативного комплекса, практически полностью сорбируется на субстрате, преимущественно это эндоглюканазы. С учетом сорбции в варианте *S* следовало ожидать активности, составляющей более 1/3 от исходной и более 1/2 от варианта *L*. В опытах 1, 3 и 4 наблюдается существенно меньшая активность.

На начальных этапах в первые 7-10 часов гидролизуется преимущественно аморфная часть целлюлозы. По мере уменьшения содержания субстрата с повышенной реакционной способностью снижается скорость гидролиза, и процесс переходит в «медленную стадию». Причиной уменьшения активности является ингибирование продуктами гидролиза стадий, в которых принимают участие ферменты, обозначенные на схеме как E_2 , E_3 , E_4 . Если ингибирование продуктами реакции при степени конверсии полисахаридов 15-40 % вносит существенный вклад в уменьшение скорости процесса, свободные от осадка гидролизаты (вариант *L*) будут обладать заметно меньшей активностью на свежем субстрате по сравнению с исходной активностью (вариант *0*).

Максимальную активность для варианта *L*, можно рассчитать из модельных экспериментов по сорбции компонентов комплекса на микрокристаллической целлюлозе. В модельных экспериментах измерена активность гидролизатов, полученных на микрокристаллической целлюлозе и бумаге. В первые 1-2 часа гидролиза в гидролизате найдено 25-30 % исходной активности, то есть значительная часть ферментативного комплекса адсорбирована субстратом. К 13 часам скорость гидролиза существенно упала, при этом конверсия субстрата составила порядка 10 %. По ходу гидролиза некоторая часть адсорбированных компонентов ферментативного комплекса перешла в раствор, в гидролизате при контакте со свежим субстратом определили примерно 40 % исходной активности.

Гидролизаты биомассы, освобожденные от осадка, проявляли на свежем субстрате заметную активность. Отметим, что скорость гидролиза, измеренная по глюкозе перед отделением гидролизата, была равна нулю. Содержание полисахаридов в биомассе составляет около 65 %, с учетом приведенных выше данных можно ожидать, что в гидролизатах содержится примерно $40/0,65 = 61,5\%$ исходной активности. За исключением опытов 2 и 3, где отмечена инактивация компонентов комплекса катионами

- 24 -

кальция, наблюдается хорошее согласие данных эксперимента с приведенными расчётами.

Полученные данные могут быть сведены к следующим утверждениям:

- При достижении 14 % конверсии по глюкозе полисахаридов биомассы, что соответствует 30-40 % выходу растворимых углеводов, скорость гидролиза падает до нуля.
- В гидролизатах сохраняется около 65 % исходной активности.
- Реакционная способность субстрата падает более чем в два раза. При замене гидролизата свежим буфером конверсия субстрата существенно ниже расчетной, найденной исходя из количества фермента, оставшегося на субстрате.

Таким образом, скорость гидролиза носит ступенчатый характер. Вплоть до достижения 30-40 % конверсия полисахаридов происходит быстро. После исчерпания доступной фазы, обладающей повышенной реакционной способностью процесс гидролиза идёт медленно.

ПРИМЕР 4. Влияние индекса кристалличности на скорость гидролиза биомассы.

Чем ниже степень (индекс) кристалличности (выше содержание аморфной части), тем выше скорость гидролиза. На **Ошибка! Источник ссылки не найден.** приводится зависимость индекса кристалличности (ИК) содержащейся в биомассе целлюлозы от времени механической активации. Для активации использована вибромельница, которая обеспечивает измельчение материала в ударно-сдвиговом режиме.

Установлено, что эффективное использование механической энергии возможно лишь в первые 40 минут активации, что соответствует снижению ИК с 70 до 33 %. Затем скорость аморфизации существенно падает, и в течение последующих 80-ти минут ИК снижается с 33 % лишь до 25 %. Снижение ИК с 70 до 55 % приводит к увеличению средней скорости гидролиза по глюкозе в 2,25 раза, последующее снижение ИК с 55 % до 33 % лишь в 1,15 раза (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Суммарные выходы растворимых продуктов гидролиза увеличиваются в 2 и 1,25 раза, соответственно. Таким образом, с точки зрения выхода целевого продукта первоначальное снижение кристалличности на 15 % оказывается в 2 раза эффективнее последующего снижения ИК на 20 %.

При гидролизе накапливается глюкоза, концентрация целлобиозы выходит на псевдостационарный уровень. Классический вид кривых зависимости концентрации этих продуктов от времени приведен на **Ошибка! Источник ссылки не найден..** С

- 25 -

увеличением общего выхода отношение глюкоза / целлобиоза возрастает (при заметных степенях превращения после точки равенства концентраций целлобиозы и глюкозы). Такой результат достигается при гидролизе бумаги и любого растительного сырья, в том числе грядей масличной пальмы. Однако на **Ошибка! Источник ссылки не найден.** можно видеть обратную картину – с увеличением выхода растворимых продуктов, отношение глюкоза / целлобиоза падает, то есть вместе с выходом растет стационарная концентрация целлобиозы. Различному ходу гидролиза не активированной и активированной биомассы можно дать следующее объяснение.

Для неактивированных субстратов с высокой степенью кристалличности, более 70 %, ферментативный гидролиз будет лимитироваться гетерогенной стадией в широком диапазоне концентрации ферментативного комплекса. Вплоть до глубоких степеней превращения концентрация промежуточного продукта целлобиозы будет оставаться псевдостационарной. Эта концентрация будет тем ниже, чем выше концентрация ферментативного комплекса. Суммарная скорость процесса, по выходу растворимых продуктов, лишь незначительно увеличивается при повышении концентрации ферментативного комплекса (в первом приближении пропорционально произведению константы скорости на концентрацию ферментативного комплекса $k_1 \times [S] \times [E_1]$, где k_1 – некоторая эффективная константа, отражающая реакционную способность субстрата, $[S]$ – поверхность субстрата, $[E_1]$ – концентрация ферментов гетерогенной стадии, пропорциональна концентрации ферментативного комплекса).

Гидролиз активированных субстратов, лимитируется гомогенной стадией, что создает условия для накопления в растворе промежуточного продукта целлобиозы. Для активированных субстратов гидролиз может протекать в трех режимах.

1. Гидролиз субстрата с очень высокой реакционной способностью протекает в условиях недостаточной концентрации ферментативного комплекса, тогда можно ожидать, что процесс в целом будет лимитироваться гомогенной стадией $k_1 \times [S] \times [E_1] > k_2 \times [E_2]$, k_1 – велико, k_2 – некоторая эффективная константа гидролиза промежуточных продуктов, $[E_2]$ – концентрация ферментов гомогенной стадии, пропорциональна концентрации ферментативного комплекса. Для этого случая гидролиз протекает в условиях заметного избытка активного субстрата по отношению эндоглюканазам, ферментам гетерогенной стадии, и недостатка ферментов гомогенной стадии. В растворе продолжительное время будет сохраняться возрастающая концентрация целлобиозы, превышающая в несколько раз концентрацию глюкозы.

- 26 -

2. Повышение концентрации ферментативного комплекса приведет к увеличению скоростей обеих стадий, как гетерогенной, так и гомогенной, следовательно, и скорости процесса в целом. Относительно высоким степеням превращения будет соответствовать псевдостационарная концентрация целлобиозы, меньшая в 1,5-2 раза концентрации глюкозы. Примечательно, что увеличение скорости образования глюкозы достигается с одной стороны за счет повышения скорости гомогенного гидролиза целлобиозы ферментами E_3 . С другой стороны повышение концентрации ферментативного комплекса, приводит к увеличению концентрации экзоглюкозидаз, способных гидролизовать аморфный субстрат и олигосахариды. Увеличение реакционной способности субстрата повышает значение этого шунтирующего пути (см. **Ошибка! Источник ссылки не найден.**), как следствие сокращается период выхода скорости образования глюкозы на стационарный уровень. Точка равенства концентраций целлобиозы и глюкозы, отмечена на **Ошибка! Источник ссылки не найден.** стрелкой, перемещается в область меньших времен. При этом в начале гидролиза концентрация глюкозы лишь незначительно меньше концентрации целлобиозы, что не характерно для исходных кристаллических субстратов. В целом процесс будет лимитироваться по-прежнему гомогенной стадией, о чем свидетельствует относительно низкое отношение глюкоза / целлобиоза, когда концентрация последней достигает псевдостационарного уровня.

Уровень псевдостационарной концентрации целлобиозы определяется отношением эффективной скорости гетерогенной стадии $k_1 \times [S] \times [E_1]$ гидролиза аморфной части субстрата к эффективной скорости гомогенной стадии $k_2 \times [E_2]$. В случае субстратов с высокой степенью кристалличности в расчет принимается скорость гетерогенной стадии гидролиза кристаллического субстрата, которая очевидна будет значительно ниже скорости гидролиза аморфной части, поэтому для активированных субстратов отношение глюкоза / целлобиоза всегда ниже.

3. При достижении определенного предела концентрации ферментативного комплекса процесс будет лимитироваться гетерогенной стадией $k_1 \times [S] \times [E_1] < k_2 \times [E_2]$. Тогда ход кривых накопления промежуточного продукта будет напоминать классический случай, с той лишь разницей, что на начальных этапах гидролиза концентрации глюкозы и целлобиозы будут сопоставимы. Дальнейшее повышение концентрации ферментативного не оказывает существенного влияния на суммарную скорость процесса и сопровождается увеличением отношения глюкоза / целлобиоза.

Приведенные выше рассуждения можно свести к следующим технологически важным выводам:

- 27 -

От начала процесса вплоть до глубоких степеней превращения гидролиз эффективно активированного субстрата отличается от гидролиза субстрата с низким содержанием аморфной фазы отношением концентрации промежуточных продуктов (целлюбиозы) к концентрации конечного продукта (глюкозы). Для активированных субстратов характерно более низкое отношение глюкоза / целлюбиоза при достижении стационарной концентрации целлюбиозы. Гидролиз активированных субстратов на начальных этапах характеризуется повышенным выходом глюкозы.

Повышение концентрации ферментативного комплекса в случае активированных субстратов приводит к заметному росту суммарной скорости процесса вплоть до насыщения субстрата эндоглюканазами.

Представляется целесообразным повышать концентрацию ферментативного комплекса до предельного значения, которое определяется областью линейной зависимости общей скорости процесса от концентрации ферментативного комплекса (до насыщения субстрата эндоглюканазами).

Дополнительные затраты, обусловленные повышением нормы расхода ферментативного комплекса должны быть компенсированы путем регенерации ферментов или повторного использования гидролизатов для осахаривания свежих субстратов. В этом случае гидролизаты с высоким содержанием растворимых углеводов, необходимым для эффективного проведения брожения, могут быть получены с максимальной скоростью.

При прочих равных условиях длительность и интенсивной механической активации сырья определяется отношением затраченной энергии к выходу растворимых углеводов. Это положение проиллюстрировано на **Ошибка! Источник ссылки не найден.** и **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, из которых следует, что на начальных этапах механическая активация протекает с наибольшей эффективностью.

ПРИМЕР 5. Повышение эффективности гидролиза биомассы.

На **Ошибка! Источник ссылки не найден.** приведены зависимости выхода растворимых углеводов от времени гидролиза для двух образцов механически активированных отходов пальмы. Видно, что скорости гидролиза для этих образцов различаются в семь раз. Значительного увеличения выхода растворимых углеводов удалось достигнуть благодаря сочетанию следующих приемов.

Удаление балластных веществ. Предварительная ферментативная обработка. Исходное сырье отходов масличной пальмы с трудом поддается механическому измельчению в ударно-сдвиговом режиме, даже в присутствии абразивного материала. В ходе группового анализа сырья показано, что образцы характеризуются заметным

- 28 -

остаточным содержанием масла. Наличие в образцах веществ, способных понижать коэффициенты трения мелющих тел о стенки реактора мельниц, приводит к нарушению ударно-сдвигового режима. В ряде случаев наблюдается проскальзывание рабочих тел, в результате чего резко падает механическая нагрузка на измельчаемый материал.

Для повышения эффективности механической активации в ударно-сдвиговом режиме предложено проводить предварительную отмыкку сырья от липидов. При использовании на стадии отмыкки комбинированных составов можно снизить негативное влияние водорастворимых веществ на активность ферментативного комплекса. В качестве таких составов использованы водные растворы, содержащие ПАВ и незначительные количества смеси ферментативных комплексов.

Сырье предварительно подвергли обработке горячей водой с последующим отжимом на прессе. На этой стадии удаляли значительную часть водорастворимых веществ и липидов, то есть компонентов, существенно снижающих эффективность механической активации.

Окончательное удаление липидов, водорастворимого лигнина, а также значительной части биогенного кремния достигали следующим образом. Полученный путем обработки горячей водой на прессе полупродукт измельчали до размера частиц 0,04-2 мм, обрабатывали слабым раствором целлюлозолитического комплекса в присутствии поверхностно-активного вещества. Благодаря этому произошло частичное разрушение надмолекулярных структур, образованных полисахаридами и лигнином, снизилась механическая прочность сырья, и оно стало пригодным для механической активации в режиме стесненного удара.

Полученный полупродукт подвергли механической активации в режиме стесненного удара с последующей экстракцией горячей водой. Выход тонкой фракции (менее 50 мкм) был увеличен с 10 до 80 %.

Использование смеси ферментативных препаратов. За счет разбавления целлюлозолитического комплекса дешевыми ферментными препаратами, которые используются для осахаривания крахмалистого сырья, можно снизить производственные затраты на этой стадии.

На Ошибке! Источник ссылки не найден. представлено действие ферментативных препаратов на отходы масличной пальмы. Исследовано действие индивидуальных ферментативных комплексов, а именно Целлюлолюкса (CLL, используется для гидролиза целлюлозы и ксиланов), Амилолюкса (AML, для предварительного осахаривания крахмала), смеси Целлюлрюкса и Амилолюкса. Видно, что разбавление

- 29 -

целлюлозолитического комплекса Амилолюксом повышает выход растворимых углеводов. Таким образом, на стадии предварительной отмычки и предварительной ферментативной обработки, могут быть использованы более доступные смеси препаратов без потери эффективности.

Повторное использование гидролизатов при ферментативном гидролизе механически активированного сырья. Выше мы показали, что максимальная скорость ферментативного гидролиза аморфизованного субстрата достигается при насыщении субстрата эндоглюканазами. Проведение гидролиза в условиях повышенной концентрации ферментативного комплекса требует регенерации ферментов либо повторного использования гидролизатов.

Предложено проводить гидролиз в серии последовательных реакторов. Схема гидролиза предусматривает пребывание субстрата в каждом реакторе в течение нескольких часов и последующий перенос субстрата и гидролиза в соседние реакторы в режиме противотока, так как это показано на **Ошибка! Источник ссылки не найден..** Согласно представленной схеме в первый реактор поступает свежий субстрат, полученный путем механической активации лигноцеллюлозного сырья. Субстрат контактирует с гидролизатом, поступившим из реактора 2. В последний реактор поступает субстрат, который уже не содержит аморфной целлюлозы и других легкогидролизуемых ферментами полисахаридов, данный субстрат подвергается воздействию свежего раствора ферментативного комплекса.

Преимуществом такого подхода является получение концентрированных гидролизатов, пригодных для процесса последующего осахаривания и совместного сбраживания (SSCF, в англоязычной литературе). Обычно гидролиз полисахаридов ведут до получения смеси мономеров и олигомеров, концентрированную смесь затем направляют в SSCF-процесс, в котором за счет ферментов осуществляется окончательный гидролиз олигомеров до мономеров и микробиологическое сбраживание последних в этиanol. В SSCF-процесс обычно используют низкие концентрации ферментов, поэтому теоретически возможно ингибиование мономерами гидролиза олигомеров. Однако наличие микроорганизмов, сбражающих мономеры до этианола, снимает ингибирующий эффект мономеров. Концентрированные гидролизаты, содержащие остаточные количества ферментов в большинстве случаев являются подходящим субстратом для SSCF-процесса.

В режиме противотока избыточная сорбция эндоглюканаз при контакте свежего раствора ферментов с субстратом (реактор 10, **Ошибка! Источник ссылки не найден.**)

- 30 -

исключается, поскольку поступающий в реактор 10 субстрат, практически не содержит аморфной фазы. Здесь пульпа субстрата промывается раствором ферментов, что позволяет направить остаточные количества растворимых углеводов в сторону SSCF-процесса. Поскольку субстрат подвергается действию свежего раствора ферментов, достигается наиболее эффективная подготовка его кристаллической части к последующей механической активации.

В средней части процесса (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**) концентрируется большая часть эндоглюканаз, ферментов ответственных за гетерогенный гидролиз полисахаридов. Такое распределение ферментов гетерогенной стадии является оптимальным.

В левой части процесса (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**), ближе SSCF-части, концентрируются ферменты гомогенной стадии гидролиза, а также компоненты ферментативного комплекса, обладающие слабыми сорбционными свойствами, однако способные эффективно гидролизовать аморфный субстрат (экзоглюкозидазы). Поступающий в первый реактор субстрат сначала подвергается действию таких ферментов, затем, по мере продвижения твердого остатка вправо, за счет действия свежих порций ферментов достигается эффективное расщепление аморфной части.

Подобная схема имеет ряд дополнительных преимуществ. Например, она позволяет выбирать для различных стадий процесса оптимальные температурные режимы. Появляется возможность дополнительного регулирования таких параметров, как pH, ионная сила, интенсивность перемешивания, то есть создавать условия, обеспечивающие максимальную устойчивость ферментативного комплекса. Благодаря этому возникает возможность контролировать степень адсорбции ферментов, регулировать степень участия компонентов ферментативного комплекса на стадиях процесса.

На **Ошибка! Источник ссылки не найден.** приводятся данные, демонстрирующие повторное использование гидролизатов для ферментативного осахаривания свежего субстрата. Эксперимент проводился с биомассой механически активированной в ударно-сдвиговом режиме с добавкой хлористого кальция.

На диаграмме слева приводятся результаты повторного использования гидролизата. После пяти часов гидролиза твердый остаток центрифугировали, гидролизат переносили на свежий субстрат, гидромодуль доводили до исходного значения добавлением буфера (на графике отмечено 1 → 2). Таким образом с помощью одной порции гидролизата, полученного в первом реакторе, было последовательно обработано еще три реактора. В

- 31 -

итоге была достигнута степень превращения по глюкозе более 15 %, общая концентрация сахаров в итоговом гидролизате соответствовала 40 % конверсии полисахаридов сырья. При гидромодуле 10 данная величина составляет порядка 30 мг/мл.

В реакторах 2-4 отмечено замедление процесса по сравнению с реактором 1. Данное обстоятельство объясняется присутствием в системе кальция, который концентрируется при переносе гидролизата из одного реактора в другой. Инактивация ферментов была частично компенсирована добавлением свежих порций ферментативного комплекса (отмечено красными точками). Наблюдалось увеличение скорости гидролиза в первые часы после добавления комплекса.

На диаграмме также приведены результаты по выходу глюкозы в процессе гидролиза сырья под действием остаточного количества ферментов. К отделенному осадку реактора 1 добавляли свежий буфер до гидромодуля 10. После пяти часов раствор отделяли и переносили в реактор 2, из которого центрифугированием удалили концентрированный гидролизат. Видно, что скорость гидролиза сохраняется постоянной при переносе разбавленных гидролизатов на субстрат подвергнутый ферментативной обработке.

Таким образом, показана эффективность повторного использования гидролизатов для обработки свежей партии субстрата. Данный подход использован для получения пригодных для SSCF-процесса концентрированных растворов углеводов из механически активированных отходов масличной пальмы. Повторное использование гидролизатов может осуществляться в серии последовательно установленных реакторов, оптимальным является режим противотока.

ПРИМЕР 6. Ступенчатое повышение реакционной способности полисахаридов сырья путем чередования механической активации и ферментативного гидролиза.

В модельных экспериментах показано, что с точки зрения затрат энергии, исчерпывающая механическая аморфизация субстрата не представляется целесообразной. После достижения некоторого порогового значения индекса кристалличности последующее увеличение количества аморфной фазы требует неприемлемо длительных времен обработки. Кроме того, увеличение количества аморфной фазы после этого порогового значения ИК приводит к меньшим увеличениям скорости гидролиза (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**).

Наиболее эффективным является подход, в котором частично аморфизованное сырье, до порогового значения ИК, подвергается ферментативной обработке в режиме последовательного переноса гидролизата на свежий субстрат. Затем сырье подвергается

- 32 -

повторной механической активации и ферментативному гидролизу. Механической активации может подвергаться как высушенный твердый остаток, так и пульпа. Ниже приводятся иллюстрация успешного применения таких обработок.

Твердые остатки, полученные путем механической обработки исходного сырья и последующего ферментативного гидролиза, подвергли мацерации – действию ферментативного комплекса, способного гидролизовать пектиновые вещества. Известно, что пектины придают тканям растений дополнительную прочность, поскольку обеспечивают «сцепление» клеточных стенок. Гидролиз пектинов позволяет разрушать ткани растений вплоть до отдельных клеток. После такой обработки твердые остатки высушили и подвергли механической активации в ударно-сдвиговом режиме.

Результаты последующего ферментативного гидролиза приведены на **Ошибка! Источник ссылки не найден..** Диаграмма слева соответствует гидролизу в условиях низкой концентрации ферментативного комплекса. В системе устанавливается относительно высокая концентрация целлобиозы, за 38 часов достигается выход по растворимым углеводам 29,5 %, общая конверсия с учетом первой стадии составляет 53 %.

При увеличении концентрации ферментативного комплекса до 5 мг/мл скорость гидролиза возрастает на начальных этапах в два раза, то есть не пропорционально концентрации ферментов (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Это говорит о том, что данная концентрация ферментативного комплекса является избыточной, а в системе наступило насыщение по эндоглюканазам. Стоит отметить, что гидролиз по-прежнему протекает в условиях высокой скорости гетерогенной стадии, благодаря чему к 6 часам в системе достигается значительная концентрация промежуточного продукта. После 6-7 часов концентрация целлобиозы падает, что свидетельствует об уменьшении скорости гетерогенной стадии. Данное падение обусловлено уменьшением содержания аморфной фазы, и свидетельствует о необходимости повторной механической активации.

Выход на данной стадии достигает 49 %, суммарная конверсия 66 %. Конверсия гемицеллюлоз, состоящих преимущественно из ксиланов, составляет 95 %. Полученные гидролизаты пригодны для повторной обработки свежих партий субстрата. Последующая механическая активация твердого остатка и его ферментативный гидролиз позволяют достигнуть за 20 часов 90 % конверсии углеводов от общего содержания полисахаридов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ подготовки отходов переработки масличной пальмы к ферментативному гидролизу, позволяющий ускорить ферментативный гидролиз полисахаридов в растворимые углеводы, предназначенный для получения растворов углеводов с целью конверсии последних в этанол или другие продукты микробиологического синтеза осахариванием и совместным сбраживанием и включающий стадии:
 - a. Удаление более 80 %, содержащихся в сырье липидов и водорастворимых веществ, путем обработки сырья горячей водой с последующим отжимом на прессе,
 - b. Снижение механической прочности сырья, которое достигается путем удаления остаточных липидов и частичного разрушения надмолекулярных структур за счет измельчения сырья до размера частиц 0,04-2 мм, обработки слабым раствором ферментативного комплекса в присутствии поверхностно-активного вещества,
 - c. Исчерпывающую экстракцию водорастворимых компонентов, удаление большей части биогенного кремния, путем механической активации в режиме стесненного удара с последующей экстракцией горячей водой.
 - d. Осахаривание сырья путем чередования механической активации твердого остатка и ферментативного гидролиза с помощью целлюлозолитического комплекса, при этом механическую активацию проводят до тех пор, пока сохраняется линейная зависимость между временем активации и выходом углеводов, который достигается при постоянной скорости гидролиза.
2. Способ по п. 1, в котором в качестве сырья предпочтительно используются пустые фруктовые грозди (Empty fruit bunches) – отходы биомассы масличной пальмы (*Elaeis guineensis*), которые образуются при производстве пальмового масла.
3. Способ по п. 1, в котором механическая активация проводится в шаровых, планетарных или вибрационных мельницах при ускорении мелющих тел от 60 до 400 м/с^2 в течение 0,5-2,0 минут, или в роторных мельницах при скорости воздействующих роторов 10-120 м/с в течение 0,2-2,0 минут, или в пневматических вихревых мельницах при скорости газового потока 10-120 м/с в течение 0,2-2,0 минут.
4. Способ по п. 1, в котором ферментативный гидролиз осуществляется в режиме противотока, то есть путем перемещения гидролизатов и твердых остатков, так как это показано на **Ошибка! Источник ссылки не найден.**

- 34 -

5. Способ по п. 1, в котором в качестве ферментативного комплекса используют обладающие деполимеразной активностью по отношению к полисахаридам ферменты, выделенные из культуральных сред *Trichoderma viride*.
6. Способ по п. 1, в котором в качестве ферментативного комплекса используют смесь обладающих деполимеразной активностью по отношению к полисахаридам ферментов, которые выделяют из культуральных сред *Trichoderma viride*, *Aspergillus awamori*, *Bacillus subtilis*.
7. Способ по п. 1, в котором в качестве поверхностно-активных веществ используют препараты марки Tween или полиэтиленоксид.
8. Способ по п. 1, в котором в качестве целлюлозолитического комплекса используют обладающие деполимеразной активностью по отношению к полисахаридам ферменты, выделенные из культуральных сред *Trichoderma viride*.
9. Способ по п. 1, в котором после механической активации и ферментативного гидролиза проводят мацерацию сырья путем обработки последнего ферментативным комплексом, выделенным из культуральных жидкостей *продуцент* (*Aspergillus foetidus*).

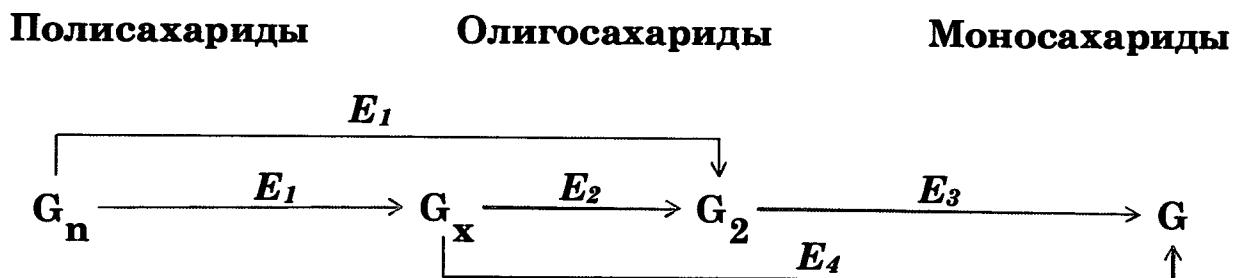


Рис. 1. Действие компонентов ферментативного комплекса на субстрат.

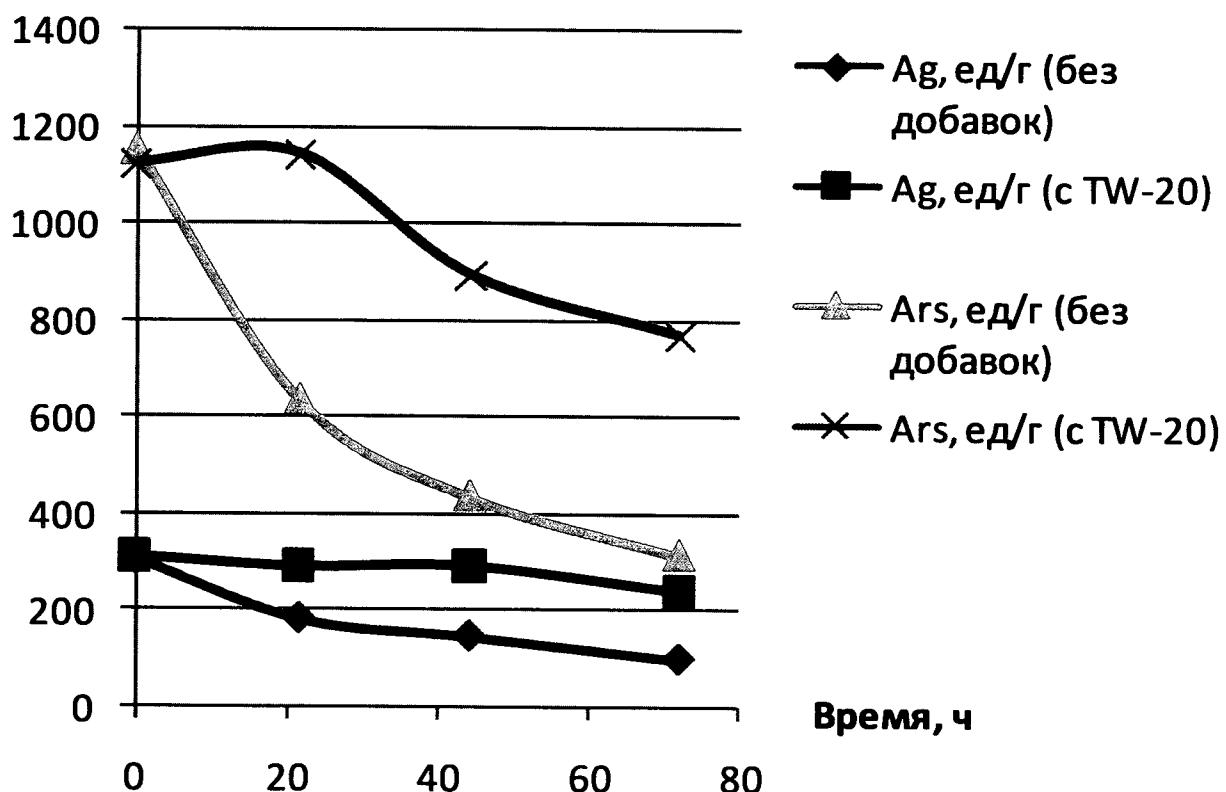


Рис. 2. Влияние добавки ПАВ на активность ферментативного комплекса в зависимости от времени инкубирования его растворов при T = 50 °C в отсутствии субстрата. Одна единица активности соответствует способности гидролизовать фильтровальную бумагу при гидромодуле 20 и T = 50 °C в течение часа с образованием 1 мг глюкозы (Ag) или восстанавливающих углеводов в пересчете на глюкозу (Ars). TW-20 – поверхностно-активное вещество марки Tween ®.

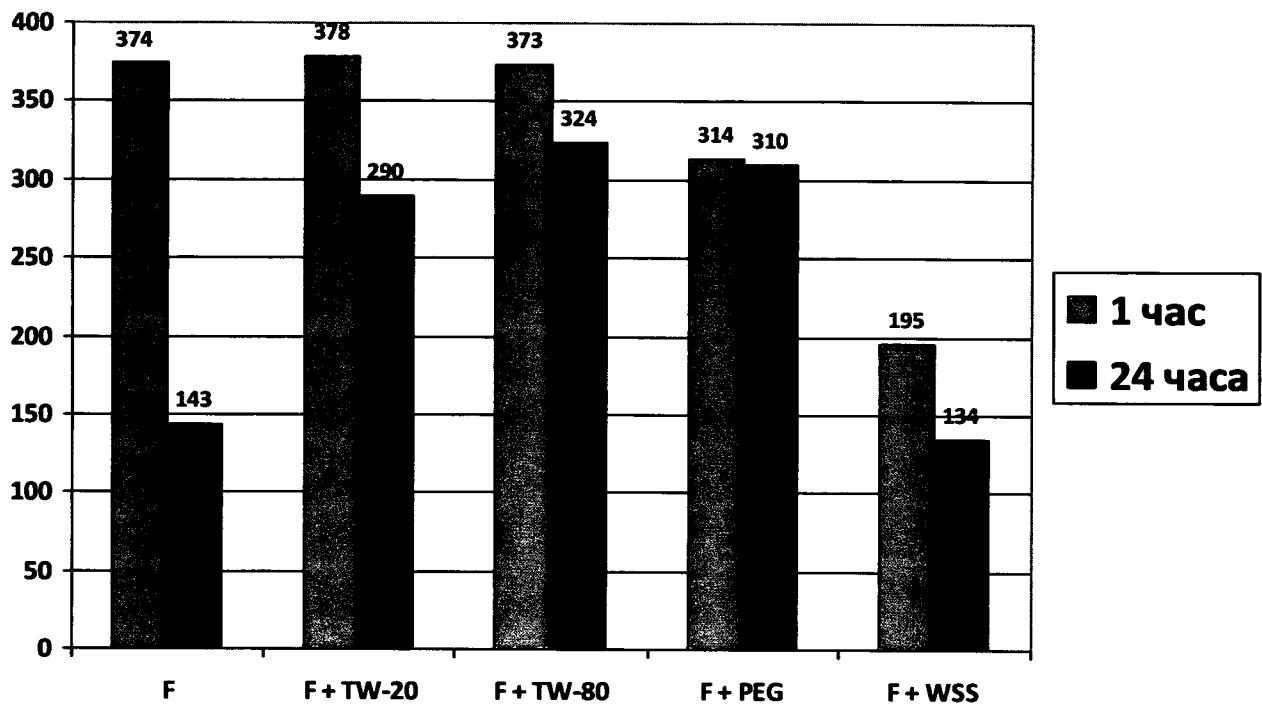


Рис. 3. Активность растворов ферментативного комплекса после инкубирования в течение 1-го и 24-х часов при $T = 50^{\circ}\text{C}$ в отсутствии субстрата. Активность измерена на бумаге, гидромодуль – 20, концентрация ферментативного комплекса 3-6 мг/мл. Одна единица активности соответствует способности гидролизовать фильтровальную бумагу при гидромодуле 20 и $T = 50^{\circ}\text{C}$ в течение часа с образованием 1 мг глюкозы. TW-20 и TW-80 – поверхностно-активные вещества марки Tween[®]; PEG – полиэтиленоксид с М.В. 2,6 млн. Да; WSS – водорастворимые компоненты биомассы 120 г/л в пересчете на растительное сырье.

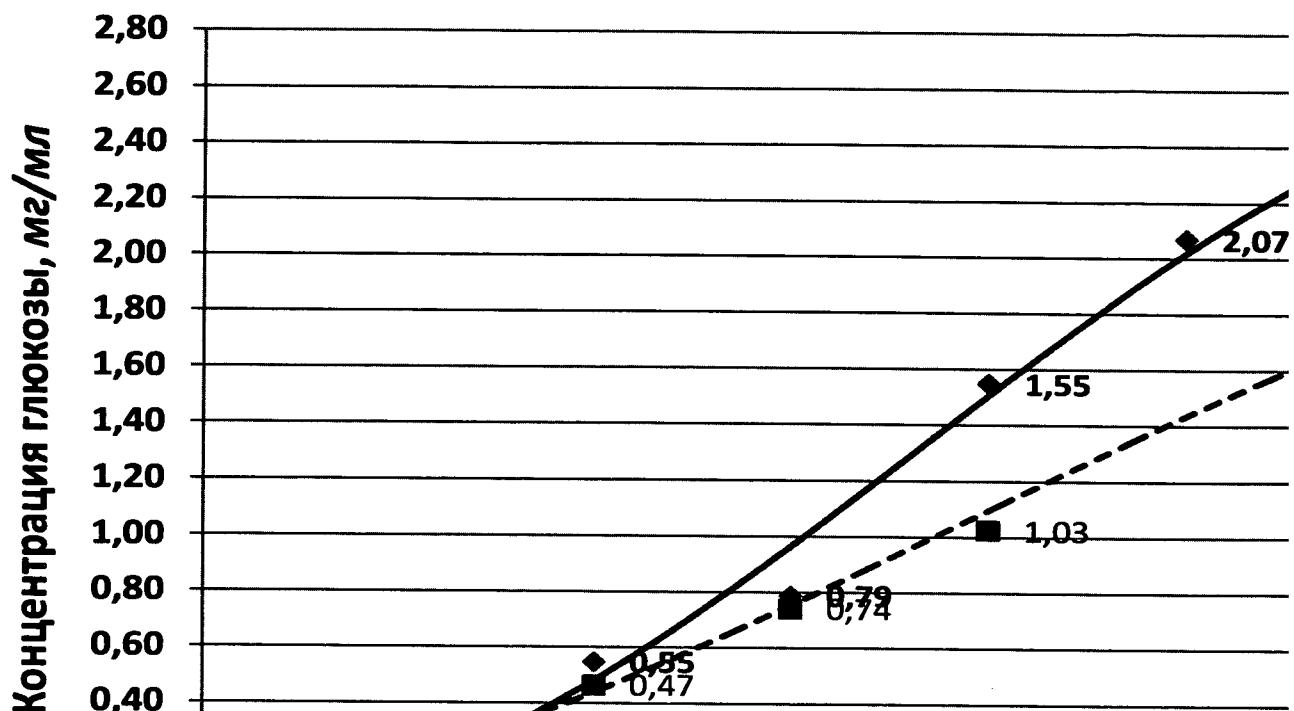


Рис. 4. Влияние добавки лигнина на выход глюкозы в первые часы гидролиза фильтровальной бумаги под действием ферментативного комплекса. Гидромодуль – 20, концентрация комплекса – 2 мг/мл (40 ед./г), буфер цитратный (рН = 4,6) без добавок ПАВ.

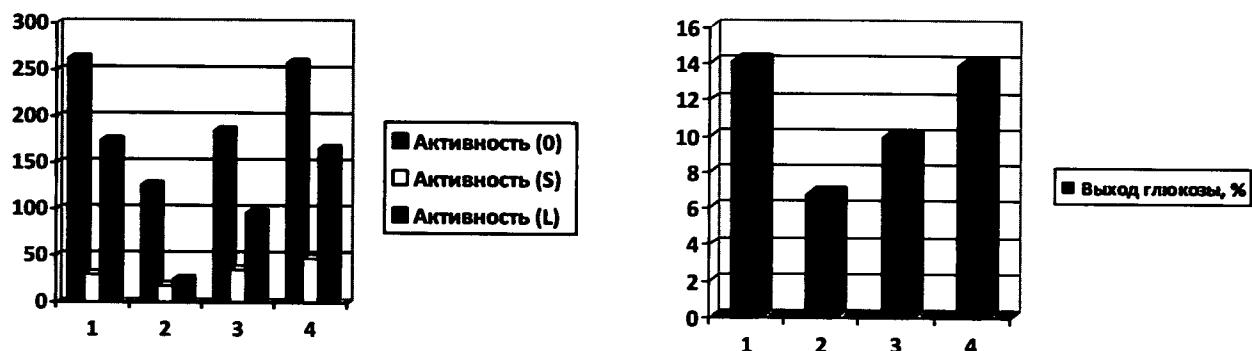


Рис. 5. Слева – Средняя за 13 часов активность ферментативного комплекса в зависимости от неорганических добавок, введенных в реакционную среду, измерена по глюкозе. Справа – выходы глюкозы в пересчете на общее содержание полисахаридов в субстрате. Субстрат – биомасса, механически активированная в условиях стесненного удара, гидромодуль – 20, концентрация ферментативного комплекса 2,2 мг/мл (44 ед./г), буфер цитратный с рН = 5,6, стабилизатор – 0,2 % раствор Tween-80. Одна единица активности соответствует способности гидролизовать полисахариды биомассы при гидромодуле 20 и Т = 50 °C в течение часа с образованием 1 мг глюкозы. Варианты опытов: (0) – активность свежего раствора ферментативного комплекса, (S) – активность компонентов комплекса, сорбированных субстратом, (L) – активность компонентов, оставшихся в растворе. 1 – механически активированный субстрат, 2 – аналогично 1, в гидролизат дополнительно добавлен хлорид кальция 20 % на растительное сырье, 3 – аналогично 2 добавлен щавелевокислый аммоний, 4 – аналогично 1, добавлен щавелевокислый аммоний. Для всех опытов 1 % выход по глюкозе соответствует 2-3 % общей конверсии полисахаридов в водорастворимые углеводы,

4/8

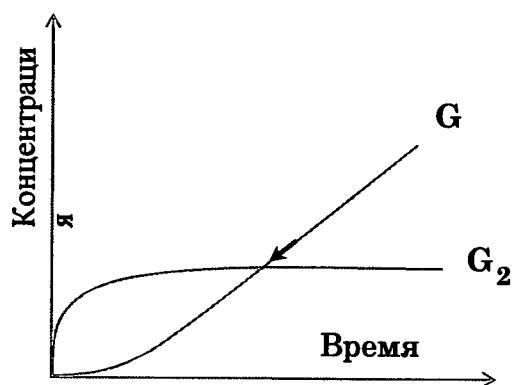


Рис. 6. Общий вид зависимости концентраций целлобиозы (G_2) и глюкозы (G) от времени гидролиза для систем с недостатком экзоглюкозидаз (E_4) и систем со сбалансированным содержанием целлобиаз (E_3) и экзоглюкозидаз (E_4), а также для случая, когда процесс лимитируется гетерогенной стадией.

5/8

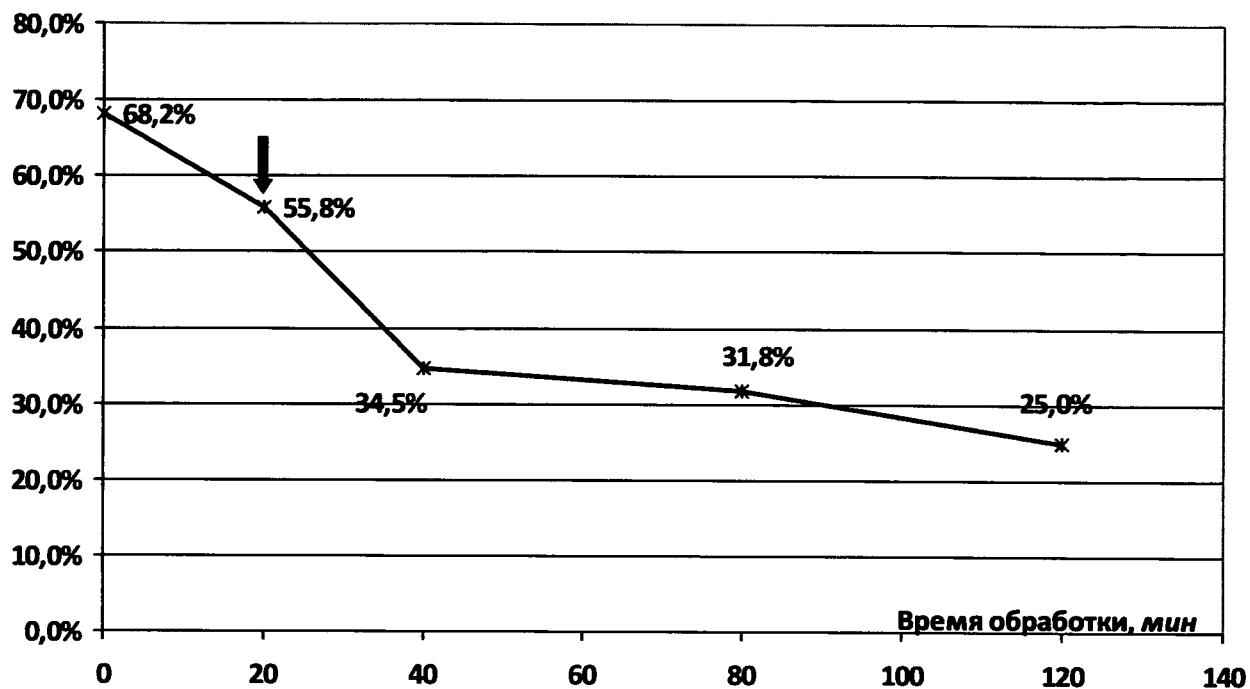


Рис. 7. Зависимость индекса кристалличности от времени обработки.

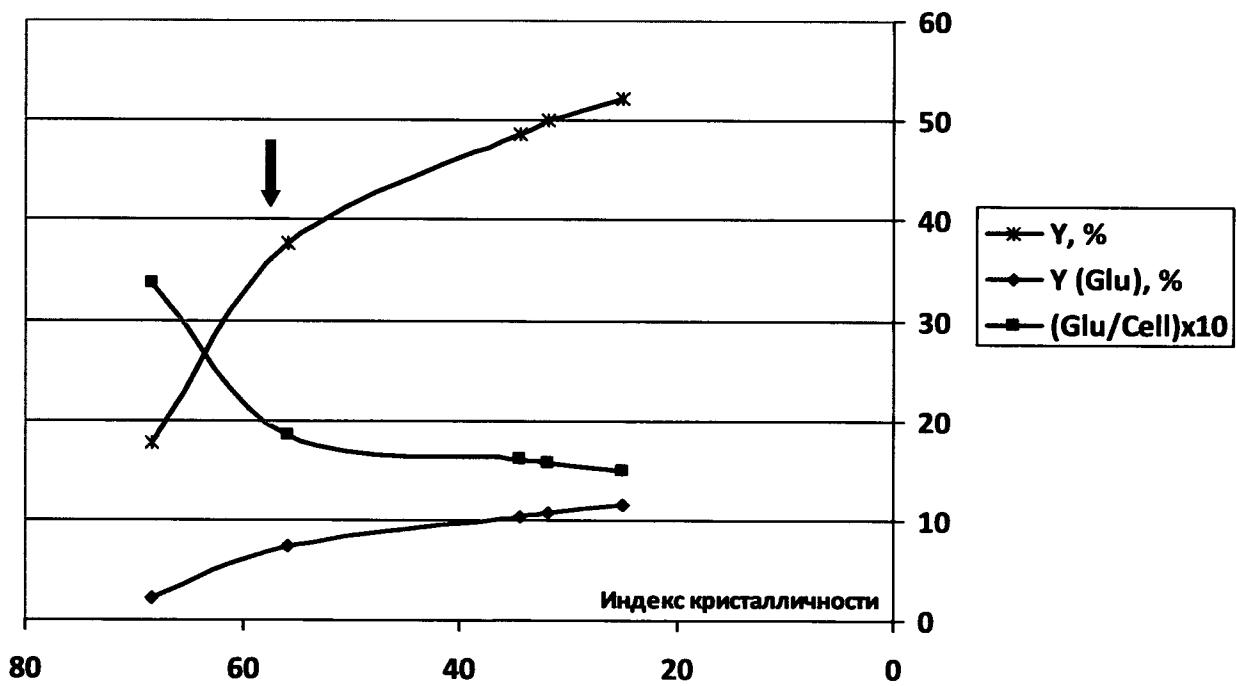


Рис. 8. Гидролиз образцов биомассы с различной степенью кристалличности целлюлозы. Концентрация глюкозы в растворе после 80 часов гидролиза, отношение содержания глюкозы к промежуточному продукту целлобиозе и выход растворимых углеводов. Условия гидролиза: гидромодуль – 20, концентрация комплекса 2,34 мг/мл (47 ед./г), буфер цитратный с pH = 5,6, стабилизатор – 0,2 % раствор Tween-80, консервант – формалин 0,1 %.

6/8

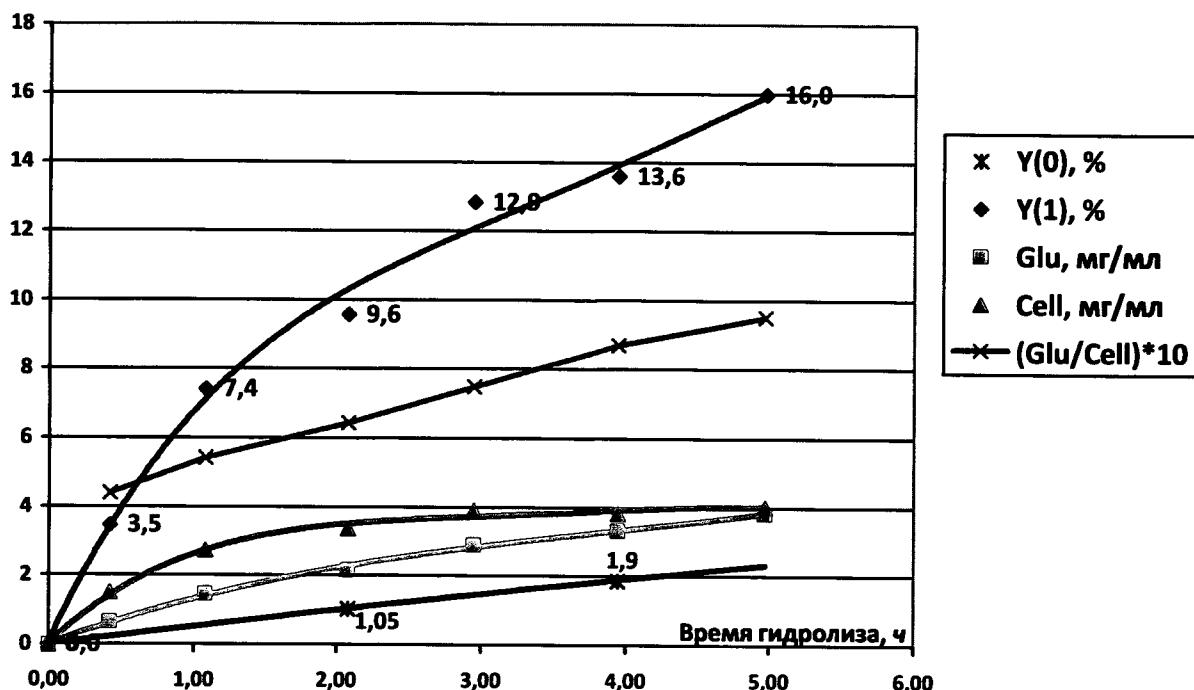


Рис. 9. Результаты гидролиза механически активированной биомассы. Условия гидролиза: гидромодуль – 8,3, концентрация комплекса 5,0 мг/мл (116 ед./г), буфер цитратный с pH = 5,6, стабилизатор – 0,2 % раствор Tween-20, консервант – 0,1 % формалин. Концентрации целлобиозы (Cell), глюкозы (Glu), общий выход водорастворимых углеводов (Y), где (0) – активированная биомасса, (1) – активированная биомасса, из которой предварительно удалили липиды, водорастворимые вещества, большую часть биогенного кремния.

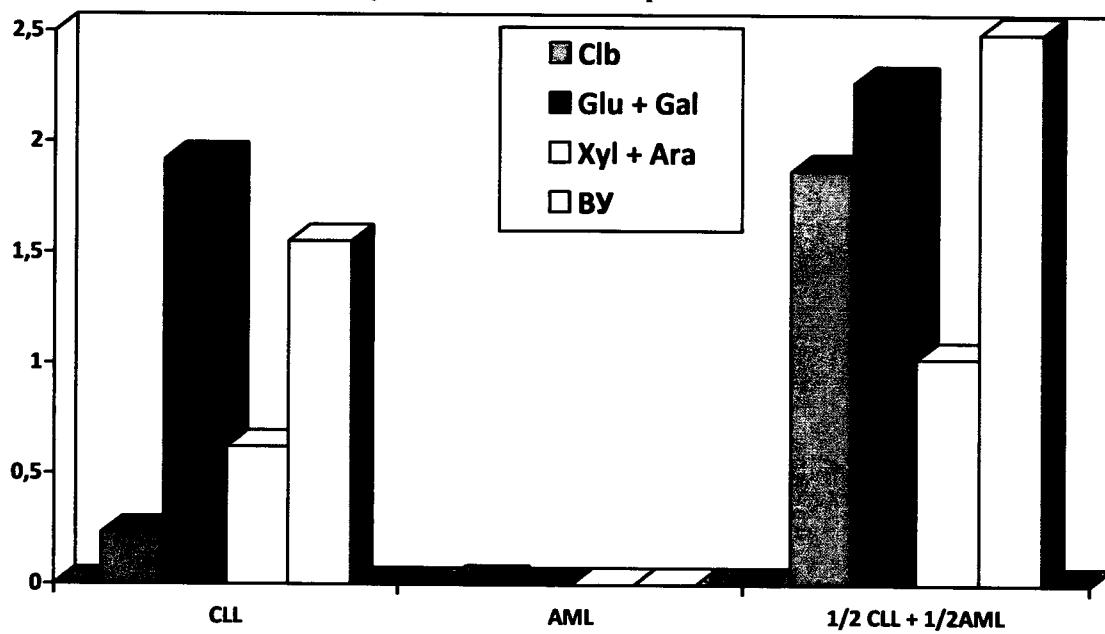


Рис. 10. Демонстрация синергетического действия ферментативных комплексов при гидролизе биомассы. Варианты опытов с ферментативными комплексами производства Сиббиопро (Бердск, НСО, РФ): CLL – целлолюкс 5 мг/мл, AML – амилолюкс 5 мг/мл, CLL + AML – смесь препаратов 5 мг/мл + 5 мг/мл. Выходы основных продуктов на начальных стадиях, мг/мл Clb – целлобиоза, Glu+Gal – гексозы, Xyl+Ara – пентозы, BY – восстанавливающие углеводы в 0,1 моль/мл.

7/8

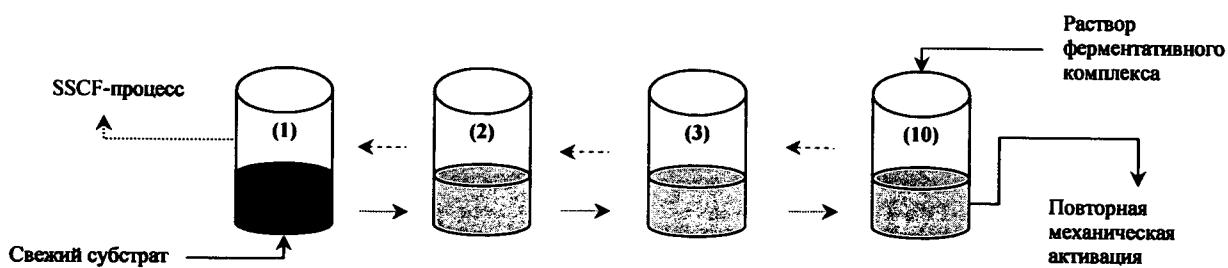


Рис. 11. Схема гидролиза в режиме противотока.

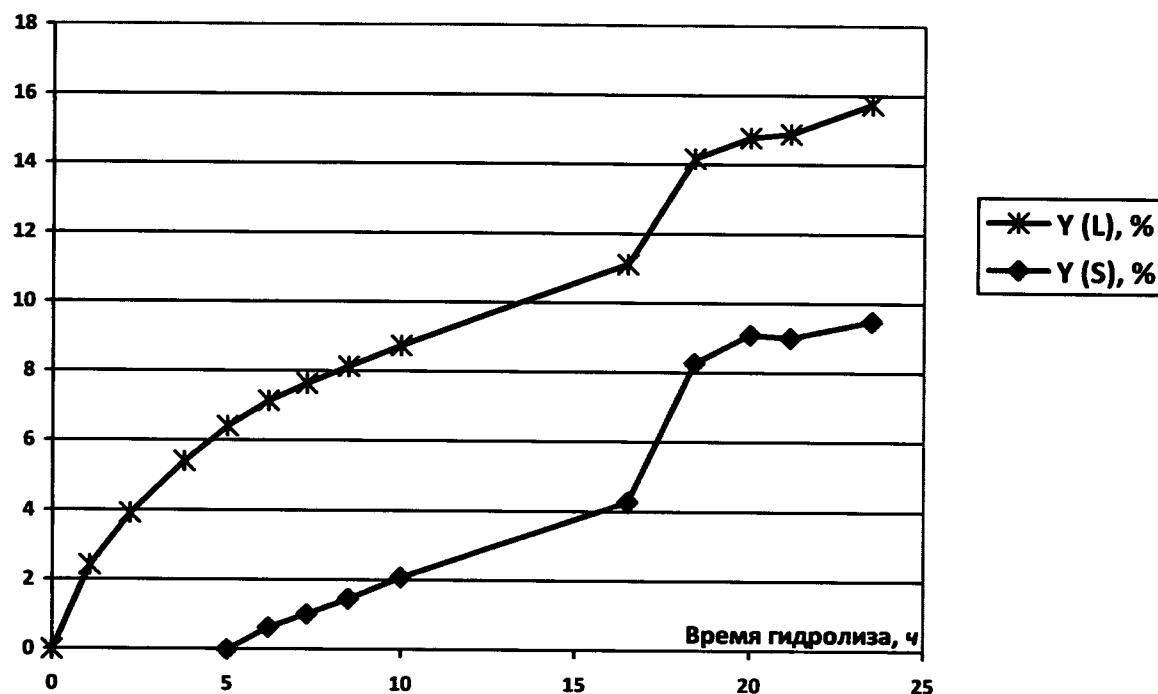


Рис. 12. Повторное использование гидролизатов в гидролизе механически активированной биомассы. Механическая активация проводилась с добавкой 5 % хлорида кальция. На графиках приводится выход глюкозы, в пересчете на полисахариды сырья при соотношении твердая фаза гидролизат 1:10. Условия гидролиза: гидромодуль – 10, концентрация комплекса 5,0 мг/мл (116 ед./г), буфер цитратный с pH = 5,6, стабилизатор – 0,2 % раствор Tween-20, консервант – 0,1 % формалин. Y (L) – выход глюкозы при повторном использовании гидролизатов, собранных центрифугированием. Y (S) – выход глюкозы при промывании твердой фазы свежим буферным раствором.

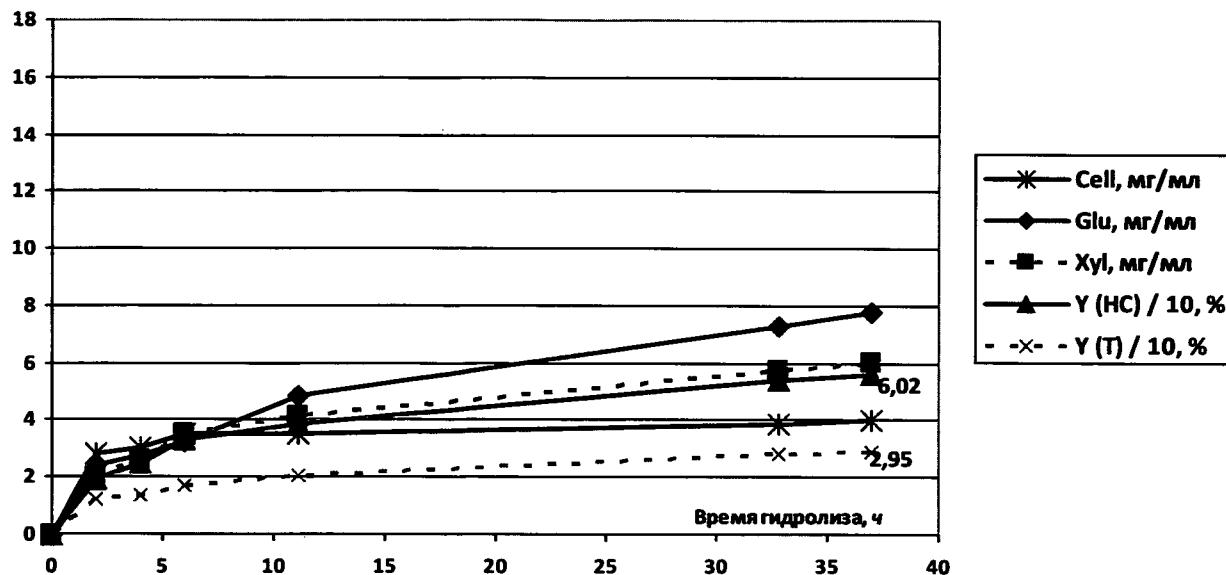


Рис. 13. Гидролиз механически активированной биомассы. Сырье активировано дважды, после первой активации проведен ферментативный гидролиз, мацерация, образец промыт и высушен, затем проведена повторная механическая активация в ударно-сдвиговом режиме. Условия гидролиза: гидромодуль – 10, концентрация комплекса 1,0 мг/мл (30 ед./г), буфер цитратный с pH = 5,6, стабилизатор – 0,2 % раствор Tween-20, консервант – формалин 0,1 %. Концентрации целлобиозы (Cell), глюкозы (Glu) и ксилизы (Xyl), общий выход водорастворимых углеводов в пересчете на полисахариды сырья (Выход/10 %), степень гидролиза гемицеллюлозы (Y(Xyl)/10 %).

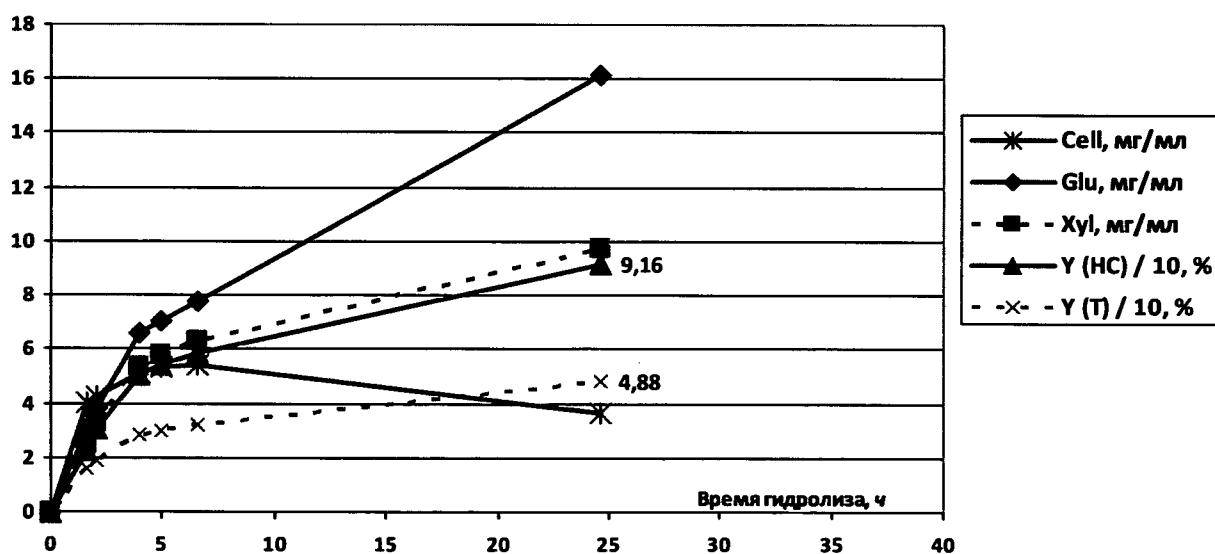


Рис. 14. Гидролиз механически активированной биомассы. Предварительная обработка см. Рис. 13. Условия гидролиза: см. Рис. 13., концентрация комплекса 5,0 мг/мл (150 ед./г). Легенда: см. Рис. 13.

ОТЧЁТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
РСТ/ЛВ2010/003408

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12P 7/10 C12P 19/02 C13K 1/02

Согласно международной патентной классификации (МПК-8)

B. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-8:
C12P

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):
EPO-Internal, WPI Data, COMPENDEX, FSTA, BIOSIS, EMBASE

C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
E	WO 2011/002329 A1 (ARTER TECHNOLOGY LIMITED) 6 января 2011 (2011-01-06) Весь документ	1-9
X	ARIFFIN, H. ET AL. : "Production of Bacterial Endoglucanase from Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch by Bacillus pumilus EB3", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, Т. 106, н. 3, сентябрь 2008 (2008-09), стр. 231-236, XP025536421,	1, 3-9
A	стр. 231, кол. 2, строка 23 – стр. 232, кол. 1, строка 18 стр. 234, кол. 2, строка 10 - стр 235, кол. 1, строка 10; таблица 4	2
		/..

последующие документы указаны в продолжении графы С.

данные о патентах-аналогах указаны в приложении.

* Особые категории ссылочных документов:

- A документ, определяющий общий уровень техники
- E более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее
- O документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
- P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета и т.д.
- "P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета.

T более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень

Y документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории

& документ, являющийся патентом-аналогом

"&" документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска:
14 октября 2011

Дата отправки настоящего отчёта о международном поиске:
25/10/2011

Наименование и адрес Международного поискового органа:
ЕР

Уполномоченное лицо:

Телефон №

ОТЧЁТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/IB2010/003408

С. (Продолжение), ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	HENDRIKS, A.T.W.M. & ZEEMAN, G. : "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass", BIORESOURCE TECHNOLOGY, Т. 100, н. 1, 2 июля 2008 (2008-07-02), стр. 10-18, XP025407559, реферат стр. 12-13, абзац 7.2.2 стр. 13, абзац 7.3.2	1-9
A	ALAM, MD.Z. ET AL. : "The factors affecting the performance of activated carbon prepared from oil palm empty fruit bunches for adsorption of phenol", CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL, Т. 155, н. 1-2, декабрь 2009 (2009-12), стр. 191-198, XP026676137, стр. 191, кол. 2, строка 18 – строка 20	1-9

ОТЧЁТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Информация о патентах-аналогах

Международная заявка №

PCT/IB2010/003408

Патентный документ, прочитанный в отчёте поиске	Дата публикации	Патент(ы)- аналог(и)	Дата публикации
WO 2011002329	A1 06-01-2011	НЕТ	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2010/003408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12P7/10 C12P19/02 C13K1/02
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, COMPENDEX, FSTA, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2011/002329 A1 (ARTER TECHNOLOGY LIMITED) 6 January 2011 (2011-01-06) the whole document -----	1-9
X	ARIFFIN, H. ET AL.: "Production of Bacterial Endoglucanase from Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch by Bacillus pumilus EB3", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, vol. 106, no. 3, September 2008 (2008-09), pages 231-236, XP025536421, page 231, column 2, line 23 - page 232, column 1, line 18 page 234, column 2, line 10 - page 235, column 1, line 10; table 4 ----- -/-	1,3-9
A		2

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 October 2011	25/10/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Fuchs, Ulrike

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2010/003408

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HENDRIKS, A.T.W.M. & ZEEMAN, G.: "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass", BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 100, no. 1, 2 July 2008 (2008-07-02), pages 10-18, XP025407559, abstract pages 12-13, paragraph 7.2.2 page 13, paragraph 7.3.2 -----	1-9
A	ALAM, MD.Z. ET AL.: "The factors affecting the performance of activated carbon prepared from oil palm empty fruit bunches for adsorption of phenol", CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL, vol. 155, no. 1-2, December 2009 (2009-12) , pages 191-198, XP026676137, page 191, column 2, line 18 - line 20 -----	1-9
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2010/003408

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011002329	A1 06-01-2011	NONE	