



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **95226** (13) **C2**

(51) **МПК** (2011.01)
C12M 1/02 (2006.01)
C12M 1/10 (2006.01)
C12M 1/16 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
C12P 19/00
C12P 7/10 (2006.01)
C12P 19/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) **ФЕРМЕНТАТИВНИЙ ГІДРОЛІЗ БІОМАС, ЩО МАЮТЬ ВИСОКИЙ ВМІСТ СУХОЇ РЕЧОВИНИ**

1

2

(21) a200707064

(22) 07.11.2005

(24) 25.07.2011

(86) PCT/IB2005/003308, 07.11.2005

(31) PA 2004 01854

(32) 29.11.2004

(33) DK

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) ФЕЛБІ КЛАУС, ДК, ЛАРСЕН ЯН, ДК, ЙОРГЕНСЕН ГЕННІНГ, ДК, ВІБЕ-ПЕДЕРСЕН ЯКОБ, ДК

(73) ІНБІКОН А/С, ДК

(56) Великий тлумачний словник сучасної української мови. К.:Ірпінь:ВТФ "Перун", 2007. стор. 257, 1489.

LINDENFELSER L A ET AL: "SOLID SUBSTRATE FERMENTOR FOR OCHRA TOXIN A PRODUCTION" APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 29, no. 3, 1975, pages 323-327.

GIOVANNOZZI-SERMANNI G ET AL: "A tumbling drum bioreactor as a tool to prepare fully controlled substrate for edible mushrooms" MEDEDELINGEN VAN DE FACULTEIT LANDBOUW WETENSCHAPPEN UNIVERSITEIT GENT, vol. 57, no. 4 PART A-B, 1992, pages 1899-1904, XP008060583 & SIXTH FORUM FOR APPLIED BIOTECHNOLOGY; BRUGES, BELGIUM; SEPTEMBER 24-25.

FELBY CLAUS ET AL: "High gravity saccharification and fermentation of wet oxidized wheat straw" ABSTRACTS OF PAPERS AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 223, no. 1-2, 2002, page CELL 94.

INGESSON H ET AL: "The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 88, no. 2, 15 June 2001 (2001-06-15), pages 177-182.

MAIS URSULA ET AL: "Enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using simultaneous ball milling." APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 98-100, April 2002 (2002-04), pages 815-832.

MAIS URSULA ET AL: "Influence of mixing regime on enzymatic saccharification of steam-exploded softwood chips." APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 98-100, April 2002 (2002-04), pages 463-472.

LYND LEE R ET AL: "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology." MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, vol. 66, no. 3, September 2002 (2002-09), pages 506-577.

LYND LEE R ET AL: "Biocommodity engineering" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 15, no. 5, September 1999 (1999-09), pages 777-793.

GREGG D ET AL: "Bioconversion of lignocellulosic residue to ethanol: Process flowsheet development" BIOMASS AND BIOENERGY, vol. 9, no. 1-5, 1995, pages 287-302.

GALBE M ET AL: "A review of the production of ethanol from softwood" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 59, 2002, pages 618-628.

GREGG DAVID ET AL: "A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process" APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 57-58, no. 0, 1996, pages 711-727.

WO A 9728306, 07.08.1997.

US A 5185255, 09.02.1993.

US A 2219668, 29.10.1940.

US A1 2004185542, 23.09.2004.

WO A 03071025, 28.08.2003.

WO A 9741274, 06.11.1997.

WO A 9830710, 16.07.1998.

US A 4409329, 11.10.1983.

WO A 02067691, 06.09.2002.

WO A03093420, 13.11.2003.

(57) 1. Спосіб розрідження біомас, що містять полісахариди, згідно з яким зазначені біомаси, що мають остаточний уміст сухої речовини між 20 % та 40 % та містять лігноцелюлозну біомасу, піддають наступному:

(13) **C2**

(11) **95226**

(19) **UA**

- а) ферментативному гідролізу з використанням принаймні одного ферменту целюлази, й
- б) перемішуванню за принципом вільного падіння, що забезпечує механічне руйнування біомаси під час гідролізу,
- де перед подальшою обробкою біомасу перетворюють на більш-менш в'язку рідину та де зазначена подальша обробка за необхідністю включає ферментацію.
2. Спосіб розрідження біомас, що містять полісахариди, згідно з яким зазначені біомаси, що мають остаточний уміст сухої речовини між 20 % та 40 % та містять головним чином лігноцелюлозну біомасу, піддають наступному:
- а) ферментативному гідролізу з використанням принаймні одного ферменту целюлази, й
- б) перемішуванню за принципом вільного падіння, що забезпечує механічне руйнування біомаси під час гідролізу,
- де перед подальшою обробкою біомасу перетворюють на більш-менш в'язку рідину та де зазначена подальша обробка за необхідністю включає ферментацію.
3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що перед попередньою обробкою лігноцелюлозна біомаса має розподіл розмірів частинок, де щонайменше 20 % (мас./мас.) мають розмір 26-70 мм.
4. Спосіб за п. 1, де біомаса, яка містить полісахариди, що містить лігноцелюлозну біомасу, додатково відрізняється тим, що головним чином містить суміш крохмалю, що містять зерна, або очищеного крохмалю, та лігноцелюлозних біомас, отриманих із сільськогосподарських культур.
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що біомаса, яка містить полісахариди, головним чином містить лігноцелюлозну біомасу, отриману зі стебел кукурудзи, макухи, соломи, наприклад рису, пшениці, жита, вівса, ячменя, жита, рапсу і сорго, м'якої деревини, твердої деревини, твердих побутових відходів або макулатури.
6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що біомаса, яка містить полісахариди, містить лігноцелюлозну біомасу, яку піддавали попередній тепловій обробці від 110 до 250 °C.
7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що його здійснюють у вигляді періодичного процесу, процесу з підживленням, безперервним або напівбезперервним процесом.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що додаткового механічного руйнування біомаси досягають за допомогою сталевих кульок або подібних засобів, які будуть зіштовхуватися з біомасою під час перемішування.

9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що перед подальшою обробкою біомасу перетворюють на більш-менш в'язку рідину протягом 3-24 годин.
10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що біомаса, яка містить полісахарид, головним чином містить лігноцелюлозну біомасу, яку піддавали попередній тепловій обробці від 160 до 200 °C.
11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що біомаса, яка містить полісахарид, головним чином містить лігноцелюлозну біомасу, яку піддавали попередній тепловій обробці протягом 1-60 хвилин.
12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що біомаса, яка містить полісахарид, головним чином містить лігноцелюлозну біомасу, яку піддавали попередній тепловій обробці протягом 5-30 хвилин.
13. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що перемішування здійснюють у барабанному змішувачі.
14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що перемішування здійснюють у барабанному змішувачі з періодично перемінним напрямком обертання.
15. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що перемішування здійснюють у барабанному змішувачі з попередньо обумовленими інтервалами обертання.
16. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що перемішування здійснюють у змішувачі з горизонтально розміщеним валом змішувача, що піднімає біомасу.
17. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що перемішування здійснюють у змішувачі з горизонтально розміщеним валом змішувача, що піднімає біомасу, та з періодично перемінним напрямком обертання.
18. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що перемішування здійснюють у змішувачі з горизонтально розміщеним валом змішувача, що піднімає біомасу, та з попередньо обумовленими інтервалами обертання.
19. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що розподіл розмірів волокон і часток лігноцелюлозної біомаси становить від 0 до 150 мм.
20. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що ступінь ферментативного гідролізу лігноцелюлозної біомаси становить 30-50 %.
21. Спосіб за будь-яким з пп. 1-2, який **відрізняється** тим, що подальша обробка включає газифікацію, гідрогенізацію, органічний синтез або одержання біогазу й кормів.

Галузь техніки, до якої належить винахід.

Даний винахід відноситься до способу розрідження й оцукрення біомас, що містять полісахариди, що мають високий вміст сухої речовини і переважно мають волокна і частки з більшими середніми розмірами. Крім того, даний винахід відноситься до додаткової утилізації таких оброблених біомас, наприклад для наступної фермен-

тації в біоетанол, спеціалізовані вуглеводи для продуктів харчування й кормів, а також сировина, що містить вуглерод для переробки в пластмасу й хімічні продукти.

У численних промислових і сільськогосподарських процесах, наприклад у комунальному господарстві, при обробці продуктів харчування й кормів і в лісовому господарстві, утворюються біомаси,

відходи й побічні продукти, що містять полімерні цукри, наприклад у формі крохмалю, целюлози й геміцелюлози. Сільськогосподарський бізнес і хімічна промисловість, а також суспільні організації виявляють значну зацікавленість до розробки способів перетворення таких біомас у більш коштовні матеріали. Таким чином, як приклад такі біомаси потенційно можуть бути перетворені в біоетанол, біогаз або хімічні продукти з використанням мікроорганізмів і/або гідролітичних ферментів. Однак більшість способів, що зараз відомі, ще не мають великомасштабного комерційного практичного застосування внаслідок їхньої високої собівартості й високої потреби в енергії, і отже їхнє використання з економічної точки зору сумнівно.

Крім того, що вуглеводи, отримані з біомаси, мають важливе значення як продукти харчування й корми, вони можуть бути використані як сировина для ряду промислових способів. У формі полімерів добре відомим продуктом є папір, у якому основним компонентом є целюлоза. Однак і у випадку перетворення в олігомери і мономери вуглеводи є важливою сировиною для ряду промислових способів. Як буде докладно описано, вони необхідні для ряду мікробіологічних процесів, але крім того вони можуть бути використані як сировина, наприклад, для ферментативної переробки в спеціалізовані вуглеводи для продуктів харчування і кормів, наприклад, трегалозу. Також олігомери і мономери вуглеводів можуть замінювати продукти нафтохімії для переробки в пластмасу й органічні хімічні речовини. Крім того, вуглеводи можуть бути використані як носії водню при каталітичній гідрогеінізації.

Тому очевидно, що якщо дешевий і розповсюджений ресурс оброблених вуглеводів можна зробити доступним для промислової переробки, це може мати значний економічний ефект.

Крохмаль є найбільш широко розповсюдженим запасним вуглеводом у рослин і зустрічається у формі гранул, які помітно відрізняються за розміром і фізичними характеристиками у різних видів. Гранули крохмалю, як правило, досить стійкі до проникнення в них як води так і гідролітичних ферментів завдяки утворенню водневих зв'язків в одній і тій же молекулі і із іншими сусідніми молекулами. Однак такі внутрімолекулярні й міжмолекулярні водневі зв'язки можуть слабшати з підвищенням температури суспензії. У випадку нагрівання водної суспензії крохмалю водневі зв'язки слабшають, абсорбується вода, і гранули крохмалю набухають. Зазначений процес звичайно називають желатинізацією, тому що утворений розчин має гелеподібну, дуже в'язку консистенцію. Хімічно крохмаль являє собою природний полімер глюкози, який звичайно нерозчинний, але може бути диспергований у воді при кімнатній температурі й складається з одиниць, що повторюються, подібної до одиниці целюлози, при цьому одиниці зв'язані разом α -1,4- і α -1,6-глюкозидними зв'язками, на відміну від β -1,4-глюкозидних зв'язків у випадку целюлози. Одиниці утворюють або компонент із нерозгалуженим ланцюгом, названий амілозою, або компонент із розгалуженим ланцюгом, названий амілопектином. Більшість насінь,

зерен і бульб рослин містять приблизно 20-25 % амілози. Але деякі, наприклад крохмаль гороху, має 60 % амілози, а деякі види зернових мають 80 % амілози. Воскуваті різновиди зернових, таких як рис, мають низький вміст амілози.

Крім крохмалю трьома основними складовими рослинної біомаси є целюлоза, геміцелюлоза й лігнін, які звичайно називають загальним терміном лігноцелюлоза. Загальний термін "біомаси, що містять полісахариди" включає як біомаси, що містять крохмаль, так і біомаси, що містять лігноцелюлозу.

Целюлоза, геміцелюлоза і лігнін присутні в різних кількостях у різних рослинах і в різних частинах рослини, і вони тісно пов'язані з утворенням структурного каркаса рослини. Целюлоза є гомополісахаридом, що повністю складається з D-глюкози, зв'язаної разом β -1,4-глюкозидними зв'язками, і маючим ступінь полімеризації до 10000. Лінійна структура целюлози забезпечує можливість утворення внутрішньо- і міжмолекулярних водневих зв'язків, які призводять до агрегації ланцюгів целюлози в мікрофібрили. Високовпорядковані області в мікрофібрилах називають кристалічними, а менш впорядковані області називають аморфними. Мікрофібрили піддаються збиранню у фібрили, які потім утворюють волокна целюлози. Частково кристалічна структура целюлози поряд з мікрофібрилярною структурою надають целюлозі високу міцність при розтяганні, така структура робить целюлозу нерозчинною у більшості розчинників і частково відповідальна за стійкість целюлози до руйнування мікроорганізмами, тобто до ферментативного гідролізу.

Геміцелюлоза є складним гетерогенним полісахаридом, що складається з декількох мономерних залишків: D-глюкози, D-галактози, D-манози, D-ксилози, L-арабінози, D-глюкуронової кислоти й 4-O-метил-D-глюкуронової кислоти. Геміцелюлоза має ступінь полімеризації нижче 200, має бічні ланцюги й може бути ацетилювана. У деревині м'яких порід, подібних до ялиці, сосні і їлі, основними фракціями геміцелюлози є галактоглюкоманан і арабіно-4-O-метилглюкуроноксилан. У деревині твердих порід, подібних до берези, тополі, осині або дубу, основними складовими геміцелюлози є 4-метилглюкуроноксилан і глюкоманан. Трав'янисті рослини, подібні до рису, пшениці, вівсу й просу, мають геміцелюлозу, головним чином яка складається із глюкуроноарабіноксилану. Лігнін являє собою складну сіть, утворену полімеризацією одиниць фенілпропану, і він становить найбільш велику неполісахаридну фракцію в лігноцелюлозі. Три мономери в лігніні являють собою паракумарильовий спирт, коніферильовий спирт і синапильовий спирт, і вони найчастіше зв'язані за допомогою арилглицерил-параарильових ефірних зв'язків.

Лігнін зв'язаний з геми-целюлозою і упродовжується у вуглеводи, тим самим забезпечуючи захист проти руйнування мікроорганізмами і хімічним руйнуванням.

Як зазначено вище, оброблені біомаси потенційно можуть бути перетворені в біоетанол або хімікати з використанням мікроорганізмів і/або гід-

ролітичних ферментів, або вуглеводи із оброблених біомас можуть бути використані як сировина в ряді промислових процесів, наприклад для ферментативної переробки в спеціалізовані вуглеводи для продуктів харчування і кормів або як замітники нафтохімічних продуктів для одержання пластмаси і органічних хімічних речовин. Додатково обробку вуглеводів у біомасі згідно з даним винаходом можна комбінувати з поділом і фракціонуванням неуглеводних компонентів. Особливо краще застосування способу згідно за даним винаходом являє собою інтегровану частину способу одержання біоетанолу.

Одержання біоетанолу із біомас, що містять полісахариди можна розділити на три стадії: 1) попередня обробка, 2) гідроліз полісахаридів до ферментованих вуглеводів 3) і ферментація вуглеводів.

Попередня обробка потрібна в тому випадку, якщо наступні і гідроліз (наприклад ферментативний і гідроліз) полісахаридів вимагає руйнування іншої захисної структури (наприклад лігніну) рослинних матеріалів. Відомо кілька методик попередньої обробки. У випадку злакових й зернових така попередня обробка може бути у формі простого сухого помела для того, щоб зробити поверхні доступними, але у випадку лігноцелюлозних біомас також необхідні термічні і/або хімічні способи. Біомаса, що містить полісахариди, яка складається наприклад з очищеного крохмалю, не вимагає зазначених способів попередньої обробки перед ферментативною обробкою. Способи попередньої обробки можуть бути засновані на кислотному гідролізі, паровому вибуху, окислюванні, екстракції лугом або етанолом тощо. Загальною особливістю методик попередньої обробки є те, що при комбінуванні з врахуванням дії можливих доданих реагентів у них використовують розм'якшення й розпушування рослинних матеріалів, яке відбувається при температурах вище 100 °C.

Після попередньої обробки наступною стадією утилізації біомас, що містять полісахариди для одержання біоетанолу або інших біохімічних продуктів є гідроліз звільненого крохмалю, целюлози й геміцелюлози до ферментованих цукрів. Якщо гідроліз здійснюють ферментативно, то це вимагає більшої кількості різних ферментів з різними способами дії. Ферменти можуть бути додані ззовні або їх можуть забезпечити мікроорганізми, що ростуть на біомасі.

Целюлозу гідролізують до глюкози гідролізуючими вуглеводи ферментами целюлазами. Загальноприйняте уявлення про систему лізису целюлози ґрунтується на розподілі целюлаз на три класи; екзо-1,4-β-D-глюканази або целобіогідролази (CBH) (ЕС 3.2.1.91), які відщеплюють одиниці целобіози від кінців ланцюгів целюлози; ендо-1,4-β-D-глюканази (EG) (ЕС 3.2.1.4), які випадковим чином гідролізують внутрішні β-1,4-глюкозидні зв'язки в ланцюзі целюлози; 1,4-β-D-глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21), яка гідролізує целобіозу до глюкози, а також відщеплює одиниці глюкози від целоолігосахаридів.

Різні цукри, що входять у геміцелюлозу, вивільняються геміцелюлазами. Система лізису гемі-

целюлози є більш складною, чим система лізису целюлози через гетерологічну природу геміцелюлози. Система містить у собі поряд з іншими ферментами ендо-1,4-β-D-ксилазази (ЕС 3.2.1.8), які гідролізують внутрішні зв'язки в ланцюзі ксилану; 1,4-β-D-ксилозидази (ЕС 3.2.1.37), які атакують ксилоолігосахариди від невідновлюючого кінця, і вивільняють ксилозу; ендо-1,4-β-D-мананази (ЕС 3.2.1.78), які розщеплюють внутрішні зв'язки; 1,4-4-β-D- манозидази (ЕС 3.2.1.25), які розщеплюють манеоолігосахариди до манози. Бічні групи видаляють рядом ферментів; α-D-галактозидазами (ЕС 3.2.1.22), α-L-арабінофуранозидазами (ЕС 3.2.1.55), α-D-глюкуронідазами (ЕС 10 3.2.1.139), циннамоїлестеразами (ЕС 3.1.1.-), ацетилксиланестеразами (ЕС 3.1.1.6) і ферулоїлестеразами (ЕС 3.1.1.73). Найбільш важливими ферментами для застосування в гідролізі крохмалю є альфа-амілази (1,4-α-D-глюканглюканогідролази, (ЕС 3.2.1.1). Вони являють собою ендо-діючі гідролази, які розщеплюють 1,4-α-D-глюкозидні зв'язки й можуть обходити, але не можуть гідролізувати 1,6-D-глюкозидні точки розгалуження. Однак для гідролізу крохмалю також можна використовувати екзо-генно діючі глікоамілази, такі як бета-амілаза (ЕС 3.2.1.2) і пулулаза (ЕС 3.2.1.41). Результатом гідролізу крохмалю головним чином є глюкоза, мальтоза, мальтотріоза, α-декстрин і різні кількості олігосахаридів. У тому випадку коли оснований на крохмалі гідролізат використовують для ферментації, переважнішим може бути додавання протеолітичних ферментів. Такі ферменти можуть заповнювати флокуляції мікроорганізмів і можуть створювати амінокислоти, доступні для мікроорганізму.

Було виявлено, що застосування окисних ферментів у комбінації з попередньою обробкою і ферментативним гідролізом біомас, що містять лігноцелюлозу може позитивно впливати на загальні і гідроліз, а також на життєздатність мікроорганізмів, використовуваних, наприклад, для наступної ферментації. Причиною такого впливу є окисне поперечне зшивання лігнінів і інших фенольних інгібіторів, що викликано окисними ферментами. Звичайно використовують лаказу (ЕС 1.10.3.2) або пероксидазу (ЕС 1.11.1.7), або ззовні, або за допомогою включення гена лакази у використовуваний мікроорганізм.

Раніше був описаний ферментативний гідроліз біомаси. Однак у випадку біомас, що містять лігноцелюлозу, таким способом успішно гідролізували тільки матеріал, що складається з волокон і часток із середнім розміром менш 1 дюйма (25,4 мм) і крім того, який має відносно низький вміст сухої речовини, тобто нижче 20 % (мас./мас.).

В US4409329 описаний гідроліз твердого целюлозного матеріалу до цукру, при цьому целюлозу гідролізували до простих цукрів обробкою суспензії гранул 3-20 % (мас./мас.) твердого корму, що містить 30-80 % (мас./мас.) целюлози, ферментативним комплексом целюлази. Вихідна сировина, що містить тверду целюлозу, мала середній розмір часток від 0,01 до 1 дюйма (0,0254-25,4 мм) у діаметрі. Для перемішування використовували перфоровані обертові лопатки.

В US2002117167A описаний ферментативний гідроліз геміцелюлози в матеріалі біомаси, що включає в себе солюбілізацію щонайменше частини геміцелюлози й гідроліз солюбілізованої геміцелюлози з одержанням щонайменше одного моносахариду. Використовувана біомаса краще являє собою суспензію у воді сирого або попередньо обробленого матеріалу. Матеріал біомаси може являти собою будь-який целюлозний матеріал, який містить геміцелюлозу. Описано, що спосіб найбільш ефективний у випадку волокон зернових культур, таких як кукурудза, пшениця, рис, овес або ячмінь.

В US2004005674A описаний спосіб ферментативного гідролізу лігноцелюлози. Руйнування лігноцелюлози до цукрів включає в себе контактування лігноцелюлози щонайменше з одним допоміжним ферментом і щонайменше однієї целюлазою. Матеріал, що містить лігноцелюлозу, розмелювали (середній розмір волокон матеріалу додатково не вказаний) і він мав низький вміст сухої речовини (0,2 г розмеленого матеріалу соломи в 10 мл розчину ферменту).

Даний винахід відноситься до способу розрідження і оцукрення біомас, що містять полісахариди, що мають відносно високий вміст сухої речовини, краще вище 20 %, і краще складаються з відносно великих волокон і частинок, краще з таким розподілом розміру волокон і частинок, при якому щонайменше 20 % (мас./мас.) біомаси перебуває в діапазоні 26-70 мкм. Крім того, спосіб особливо придатний для розрідження й оцукрення біомас, що містять полісахариди, головним чином які містять крохмаль очищений крохмаль, целюлозу, геміцелюлозу й лігнін, наприклад зерна або пшеничної соломи. У випадку лігноцелюлозних біомас їх переважно попередньо обробляють, піддаючи впливу температур від 110 до 250 °С протягом 1-60 хв таким чином, у такий спосіб який забезпечує доступність целюлози для ферментів і в той же час забезпечує обмежений вміст інгібіторів ферментації в попередньо обробленій біомасі. В даному винаході поєднують ферментативний гідроліз, оснований на комбінації гідролітичних ферментів, включаючи фермент, що викликає гідроліз вуглеводів, і окисний фермент, з типом перемішування, оснований на принципі дії сили ваги, що забезпечує прикладання до біомас механічних сил, головним чином зусилля зсуву й сили розриву. Кращими типами перемішування є наприклад перемішування в змішувачах, що працюють за принципом вільного падіння, таких як змішувачі барабанного типу, змішувачі на основі перекидання або подібні змішувачі пристрої.

Одержання концентрованих розчинів цукрів вигідно у зв'язку з наступною ферментацією або іншими мікробіологічними процесами завдяки підвищеній об'ємній продуктивності і зниженій собівартості наступної обробки. У випадку одержання біоетанолу потреби в енергії для перегонки істотно знижуються, якщо бульйон для ферментації містить більше 4 % етанолу (Galbe and Zacchi, 2002). Для цього потрібна концентрація цукру вище 8 %, що у випадку більшості типів лігноцелюлозних біомас відповідає початковому вмісту сухої речо-

вини вище 20 %. Іншими словами бажано піддавати ферментативному гідролізу біомаси, що містять полісахариди з високим вмістом сухої речовини, краще вище 20 %, щоб потім мати можливість одержувати бульйони, що містять біоетанол для ферментації, підходящі для перегонки етанолу.

Способи згідно з даним винаходом звичайно забезпечують ступінь ферментативного гідролізу 30-50 %. Однак в оптимізованих умовах можна одержати ще більш високий ступінь ферментативного гідролізу. Тому розріджена й оцукрена біомаса буде містити відносно більші кількості глюкози, ксилози, целобіози, лігніну, незруйнованої целюлози й геміцелюлози й крім того активні ферменти, що підходять для наступної обробки, тобто процесів ферментації (етанол, молочна кислота і т.д.). Розріджені біомаси також можуть бути використані для газифікації, гідрогенізації, органічного синтезу або одержання біогазу й кормів.

Якщо біомаси, що містять полісахариди є лігноцелюлозними, то попередня обробка повинна привести до того, щоб структура лігноцелюлозного вмісту стала більш доступною для ферментів, і в той же час концентрації шкідливих інгібуючих побічних продуктів, таких як оцтова кислота, фурфураль і гідроксиметилфурфураль, в основному залишалися низькими. Існує кілька методик досягнення вказаного, при яких лігноцелюлозний матеріал піддають впливу температур від 110 до 250 °С протягом 1-60 хв, наприклад:

- екстракція гарячою водою;
- багатоступінчастий гідроліз розведеною кислотою, при якому розчинена речовина видаляється до утворення інгібуючих речовин;
- гідроліз розведеною кислотою в умовах відносно низької жорсткості;
- лужне вологе окислювання;
- паровий вибух;
- майже будь-яка попередня обробка з наступною детоксикацією.

Біомаси, що містять полісахариди згідно з даним винаходом включають будь-який матеріал, що містить полімерні цукри, наприклад у формі крохмалю, а також очищеного крохмалю, целюлози й геміцелюлози. Кращі біомаси, що мають вміст сухої речовини більше 20 %.

Відповідні типи біомас для ферментативного гідролізу й перемішування згідно з даним винаходом можуть включати біомаси, отримані із сільськогосподарських культур, наприклад такі як:

- крохмаль, наприклад зерно, що містить крохмаль і очищений крохмаль;
- кукурудзяні стебла;
- макуха;
- солома, наприклад солома рису, пшениці, жита, вівса, ячменя, жита, рапсу, сорго;
- м'яка деревина, наприклад *Pinus sylvestris*, *Pinus radiata*;
- тверда деревина, наприклад *Salix* spp., *Eucalyptus* spp.;
- бульби, наприклад буряк, картопля;
- зерно, наприклад рис, пшениця, жито, овес, ячмінь, жито, рапс, сорго й кукурудза;
- макулатура, волокнисті фракції від переробки біогазу, компост, залишки після обробки олійної

пальми, тверді побутові відходи або тому подібне з подібним вмістом сухої речовини.

Якщо біомаси, що містять полісахариди є лігноцелюлозними, то матеріал до попередньої обробки може бути нарізаний на шматочки, при цьому 20 % (мас./мас.) біомаси краще має розмір у діапазоні 26-70 мм. Попередньо оброблений матеріал краще має вміст сухої речовини більше 20 % перед надходженням у змішувачий пристрій. Крім вивільнення з біомас вуглеводів, у процесі попередньої обробки стерилізують і частково розчиняють біомасу і у той же час вимивають хлорид калію із фракції лігніну.

Перемішування, здійснюване за способом згідно із даним винаходом, служить щонайменше чотирьом цілям.

По-перше, перемішування забезпечує тісний контакт між використовуваними ферментами й біомасою, що містить полісахариди (субстратом), тому що в більшості випадків біомаса буде нерозчинна або тільки дуже погано розчинна.

По-друге, механічна робота, здійснювана відносно матеріалу під час перемішування, допомагає розірвати більшу кількість волокон біомаси і часток, і тому буде сприяти збільшенню площі поверхні матеріалу. Це збільшить доступність наприклад целюлози й геміцелюлози для використовуваних ферментів. Щоб додатково збільшити механічну роботу, здійснену відносно матеріалу, у барабан можуть бути додані сталеві кульки або подібні засоби, які будуть зіштовхуватися з матеріалом.

По-третє, перемішування матеріалу запобігає локальному нагромадженню високої концентрації целюлози, яке - як добре відомо фахівцям у даній галузі - можуть наприклад інгібувати ферменти целюлази, особливо целобіогідролази.

По-четверте, важливою властивістю ферментів целюлаз є вплив зв'язуючих целюлозу доменів (CBD) на ефективність ферменту. CBD є функціональними частинами руйнуючих целюлозу ферментів. CBD забезпечує адгезію водорозчинного ферменту на поверхні нерозчинного субстрату (целюлози). Тісний зв'язок між ферментом і целюлозою, забезпечуваний CBD, збільшує швидкість каталізу й стабільність ферменту. Щоб гідролізувати целюлозу, фермент повинен змінити положення CBD на цепі целюлози. Передбачається, що механічна дія, тобто перемішування, важливо для переміщення CBD і отже для ферментативної дії ферментів уздовж ланцюга целюлози.

На додаток до вищесказаного слід зазначити, що ферментативний гідроліз біомаси традиційно проводили в реакторах з мішалками, обладнаними лопатевим колесом (наприклад турбіною Раштона або лопатевим колесом Intemig), змонтованим на центрально розташованому валу лопатевого колеса, подібних до реактора, що використовують при промисловій ферментації. Через таке устаткування розчини з високою в'язкістю, дуже липкого або матеріалу, що містить велику кількість сухої речовини не можуть бути ефективно перемішані, і в результаті створюються зони з дуже поганим перемішуванням або не перемішані зони. Крім того, перемішування таких розчинів вимагає дуже

великого споживання енергії, що збитково з погляду економічності процесу. Раніше при роботі з біомасами, що містять полісахариди обмежувалися можливою верхньою межею приблизно 20 %. Принцип перемішування на основі дії сили ваги згідно із даним винаходом вирішує вказану проблему і може бути використаний у випадку біомас, що містять полісахариди зі вмістом сухої речовини до 80 %, краще 20-50 %. Принцип перемішування на основі дії сили ваги згідно з даним винаходом легко можна здійснювати в більшому масштабі й застосовувати стосовно всіх видів біомас, крім очищеного крохмалю, що містить до більш ніж 80 % целюлози.

На відміну від звичайних реакторів з мішалками, традиційно використовуваних для ферментативного гідролізу, принцип перемішування, заснований на дії сили ваги, тобто застосування барабанного змішувача, змішувача з підніманням біомаси за допомогою обертання або подібного пристрою для перемішування, що використовує принцип вільного падіння, одночасно забезпечує ефективне перемішування навіть при невеликій застосованій потужності і високому вмісту сухої речовини і, крім того, здійснює механічну обробку/руйнування за допомогою сили ваги, включаючи зусилля зрушення і сили розриву, що діють між матеріалом і барабаном, а також сил, що виникають у результаті зіткнення між падаючим матеріалом і дном барабана, і одночасно позитивно позначається на впливі зв'язуючих целюлозу доменів (CBD) на ефективність ферменту.

Хоча відома обробка незмішувальних рослинних матеріалів, таких як біомаса, що містить полісахариди з відносно високим вмістом сухої речовини і великим середнім розміром волокон і часток, у результаті ферментації у твердому стані або у біореакторах, у яких для перемішування використовують змішувачі барабанного типу (Giovanozzi et al. 2002), такий принцип раніше не був реалізований у спеціалізованому способі розрідження/оцукрювання або в процесі ферментації для одержання біоетанолу.

Даний винахід відноситься до способу обробки біомас при відносно високому вмісті сухої речовини, наприклад вмісті сухої речовини від 20 до 80 %, краще від 20 до 50 %. Крім того, спосіб згідно з даним винаходом забезпечує ефективне розрідження й оцукрювання, що створює можливість наприклад для прямого використання кінцевого продукту у ферментерах.

Ферменти, здатні здійснювати перетворення крохмалю, целюлози й геміцелюлози або їхніх частин у глюкозу, ксиліозу і целобіозу, додають до біомаси або в нативній формі, або у формі мікроорганізмів, що викликають накопичення таких ферментів. pH і температуру біомаси корегують відповідно до оптимуму pH і оптимуму температури для застосовуваних ферментів.

Залежно від завантаження ферменту біомаса буде розріджена і оцукрена до рідини без якогось залишку великих волокон і часток або тільки з невеликим залишком великих волокон або часток протягом 3-24 годин. Додавання метаболізуючого глюкозу мікроорганізму в будь-який зада-

ний час протягом гідролізу і розрідження може підвищити ступінь ферментативного гідролізу, тому що при цьому видаляються інгібуючі ферментативні продукти.

Спосіб згідно із даним винаходом можна здійснити з використанням наступних кращих технічних параметрів.

- Вміст сухої речовини: 20-80 %, краще 25-70%, ще краще 25-60 %, ще краще 25-50 % або 25-40 % і найкраще 25-35 %.

- Розподіл розмірів волокон і часток лігноцелюлозної біомаси: 0-150 мм, краще 5-125 мм, ще краще 10-100 мм, ще краще 15-90 мм або 20-80 мм і найкраще 26-70мм. Краще розподіл розмірів волокон і часток визначають як наявність щонайменше 20 % (мас./мас.) лігноцелюлозної біомаси з розмірами у межах кращого інтервалу.

Якщо біомаса, що містить полісахариди є лігноцелюлозною, то її необхідно попередньо обробляти, наприклад за допомогою екстракції гарячою водою. У тому випадку якщо обрано гідротермічну попередню обробку, кращими є наступні технічні параметри:

- Температура попередньої обробки: 110-250°C, краще 120-240 °C, більш краще 130-230 °C, більш краще 140-220 °C, більш краще 150-210 °C, більш краще 160-200 °C, ще більш краще 170-200°C або найбільш краще 180-200 °C.

- Час попередньої обробки: 1-60 хв, краще 2-55 хв, більш краще 3-50 хв, більш краще 4-45 хв, більш краще 5-40 хв, більш краще 5-35 хв, більш краще 5-30 хв, більш краще 5-25 хв, більш краще 5-20 хв і найбільш краще 5-15 хв.

- Вміст сухої речовини після попередньої обробки становить щонайменше 20 %мас./мас.

Ферментативна обробка біомас, що містять полісахариди у змішувачі, що працює на основі дії сили ваги:

Якщо використовують посудину, основу на принципі змішування при вільному падінні, у формі реактора з горизонтально розміщеним валом змішувача, що піднімає біомасу, або подібний змішувачу пристрій, то кращими є наступні технічні параметри:

- Швидкість обертання: 0-30 об./хв, краще 0-20об./хв, більш краще 0-15 об./хв, ще більш краще 0-10 об./хв і найбільш краще 0-5 об./хв.

- Обертання з періодично перемінним напрямком обертання.

- Обертання з попередньо обумовленими інтервалами.

Оптимальна швидкість обертання буде залежати від об'єму посудини, таким чином краща швидкість обертання може бути відносно високою, коли процес здійснюють у відносно невеликій посудині, а також вона може бути відносно невеликою, коли процес здійснюють у відносно великій посудині.

- Ферменти для лігноцелюлозної біомаси:
 - целобіаза (наприклад Novozym 188)
 - целюлаза (наприклад Celluclast 1.5 FG L)
 - Завантаження ферменту в одиницях фільтрувального паперу (FPU)/г СВ. 1 FPU дорівнює кількості ферменту, необхідного для того, щоб гідролізувати 1 мкмоль/хв глікозидних зв'язків на

фільтрувальному папері Whatmann №1 у конкретних умовах, добре відомих фахівцям в даній галузі. Однак, ферментативна активність у принципі може бути забезпечена в будь-якій можливій формі, включаючи додавання мікроорганізмів, що призводять до необхідної ферментативної активності: що відповідає 0,001-15 FPU/г сухої речовини, краще 0,01-10 FPU/г сухої речовини, більш краще 0,1-8 FPU/г сухої речовини, більш краще 1-7 FPU/г сухої речовини і найбільш краще менше 6 FPU/м.

- Ферменти для біомаси, що містить крохмаль:

- Ферменти для обробки крохмалю: альфа-амілази і глюкоамілази.

- Час обробки у випадку ферментативного гідролізу: 0-72 години, краще 1-60 годин, більш краще 2-48 години і більш краще 3-24 години, наприклад 4-24 години, наприклад 6-24 години, наприклад 8-24 години, наприклад 10-24, наприклад 12-24 години, наприклад 18-24 години або 22 години.

- Температура для ферментативного гідролізу. Корегується відповідно до оптимальних температур для застосовуваних ферментативних активностей: 0-105 °C, краще 10-100 °C, більш краще 15-90 °C, більш краще 20-80 °C, більш краще 25-70 °C і найбільше краще 30-70 °C, наприклад 40-45 °C або кімнатна температура.

- рН біомаси. Коректується відповідно до оптимуму рН для застосовуваних ферментативних активностей: 3-12, наприклад 5-10, наприклад 6-9, наприклад 7-8 і краще 4-11.

- Ферментативна обробка може бути проведена у вигляді періодичного процесу, процесу з підживленням або безперервним процесом.

Приклад 1: Ферментативний гідроліз у лабораторному масштабі

Пресовану попередньо оброблену пшеничну соломку із середнім розміром приблизно 40 мм (протієчійна водна екстракція при 180-200 °C протягом 5-10 хв., відносна витрата води і сухої речовини 5:1), що відповідає 25 г сухої маси (= 67,0 г попередньо обробленої соломи) поміщали в поліетиленовий пакет. Змішували 0,75 мл Novozym 188, 3,75 мл Celluclast 1.5 FG L і 1 1,9 мл 50 мМ натрій-цитратного буфера, рН 5,0, і присипували соломку. Це призводило до кінцевого вмісту сухої речовини 30 %. Завантаження ферментів відповідало 10 одиницям фільтрувального паперу (FPU)/г СВ.

Змішувач складався з барабана (1,0 м довжиною і 0,78 м у діаметрі) з 5 внутрішніми ребрами уздовж довгої осі, щоб забезпечити належне перемішування матеріалу. Барабан обертася в напрямку горизонтальної осі зі швидкістю 26 об./хв. Перемішування/гідроліз матеріалу здійснювали протягом 18-24 годин при кімнатній температурі. Це приводило до одержання густої пасту, що не містить ніяких залишків великих волокон. У контрольному пакеті з таким же завантаженням ферментів, але без перемішування не спостерігали ознак розкладання соломи.

Частина матеріалу, отриманого після ферментативного гідролізу протягом 24 годин (кількість, що відповідає 29 г сухої речовини) розбавляли до 15 % сухої речовини в пляшці Blu cap і додавали

дріжджі (пекарські дріжджі, De Danske Spritfabrikker). Пляшку закривали повітряною пробкою і поміщали на 72 години при 30 °C з перемішуванням при 500 об./хв. Отримана в результаті рідина містила 33 г/л етанолу, 10 г/л ксилози. Глюкозу не виявляли, що свідчить про те, що дріжджі були спроможні утилізувати всю глюкозу, утворену під час гідролізу. За умови що вихід етанолу відносно глюкози становить 0,5 г етанолу на г глюкози, це відповідало перетворенню 70 % вихідної целюлози.

Приклад 2: Ферментативний гідроліз у пілотному масштабі

Пресовану попередньо оброблену пшеничну соломку із середнім розміром приблизно 40 мм (попередньо оброблену протітеційною водною екстракцією при 180-200 °C протягом 5-10 хв. з відносною витратою води і сухої речовини 5:1), що відповідає 7 кг сухої маси (= 20 кг попередньо обробленої соломи) поміщали у звичайну бетономішалку з обертовим барабаном з горизонтальною віссю, нахиленою приблизно на 10 градусів. Мішалка мала 2 внутрішні ребра уздовж довгої осі, щоб гарантувати перемішування матеріалу. На отвір установлювали кришку, щоб уникнути випару з мішалки. Барабан мішалки обертася в напрямку горизонтальної осі зі швидкістю 29 об./хв. До соломи додавали 200-1150 мл Celluclast 1.5 FG L і 40-225 мл Novozym 188. Це приводило до одержання кінцевого вмісту сухої речовини 30 %. Завантаження ферментів відповідало 3-15 FPU/г СВ. рН доводили до 4,8-5,0 додаванням карбонату натрію.

Бетономішалку нагрівали до 40-45 °C, використовуючи тепловентилятор. Перемішування/гідроліз матеріалу здійснювали протягом 22 годин. Залежно від завантаження ферментів це приводило до одержання більш-менш в'язкої рідини, що не містить ніяких залишків великих волокон. Попередньо оброблену соломку руйнували до утворення пасту приблизно за 3-5 годин. Після 5-24 годин перемішування паста перетворювалася у в'язку рідину. У контрольних експериментах тільки з попередньо обробленої пшеничної соломи або із пшеничної соломи, попередньо обробленої тільки при 160 °C, але з використанням такого ж завантаження ферменту, не спостерігали ознак розрідження соломи.

Одночасне оцукрювання і ферментацію здійснювали, додаючи в бетономішалку дріжджі після 24 годин гідролізу при 40-45 °C з використанням завантаження ферментів 10-15 FPU/г СВ. Температурі давали можливість знизитися нижче 35 °C і додавали пресовані пекарські дріжджі (De Danske Spritfabrikker) до концентрації приблизно 1 % (мас./мас.), виходячи з початкової сухої маси соломи. Оцукрювання і ферментацію продовжували протягом 48 годин при 25 °C.

Отриманий у результаті матеріал центрифугували протягом 15 хв при 2500 об./хв. Надосад фільтрували через 0,45 мкм- фільтр і аналізували відносно цукрів, використовуючи ВЭЖХ. При завантаженні ферментів 15 FPU/г СВ, надосад містив 70 г/л глюкози, 30 г/л ксилози через 24 години гідролізу. Це відповідало 50 % гідролізу целюлози й

геміцелюлози, що спочатку були присутні у соломі. Одночасне оцукрювання і ферментація з використанням завантаження ферменту 10 FPU/г СВ приводили до одержання 42 г/л етанолу і 30 г/л ксилози.

Приклад 3: Розрідження, гідроліз і ферментація

Конструювали реактор для гідролізу, щоб здійснити експерименти по розрідженню і гідролізу твердої речовини з концентраціями більше 20 % СВ (фіг. 1). Реактор складався з горизонтально розміщеного барабана, розділеного на 5 окремих камер, кожна з яких мала ширину 20 см і діаметр 60 см. Горизонтальний обертовий вал, обладнаний трьома лопатками в кожній камері, використовували для перемішування/збовтування. Як привід використовували мотор 1,1 кВт, і швидкість обертання регулювали в діапазоні від 2,5 до 16,5 об./хв. Напрямок обертання програмували так, щоб він мінявся двічі за хвилину: за годинниковою стрілкою і проти годинникової стрілки. Заповнена водою нагрівальна оболонка (рубашка) із зовнішньої сторони забезпечувала контроль температури до 80 °C.

Камери заповнювали пресованою попередньо обробленою пшеничною соломкою із середнім розміром наприклад 40 мм (попередньо обробленої протітеційною водною екстракцією при 180-200 °C протягом 5-10 хв з відносною витратою води і сухої речовини 5:1) і водою, одержуючи вихідний вміст СВ від 20 до 40 %. Додавали Celluclast 1.5 FG L і Novozym 188 у співвідношенні 5:1, одержуючи завантаження ферментів 7 FPU на г СВ. Розрідження і гідроліз здійснювали при 50 °C і р від 4,8 до 5,0. Швидкість перемішування становила 6,6 об./хв. Експерименти по одночасному оцукрюванню і ферментації (SSF) здійснювали, знижуючи температуру до 32 °C після 8 - годинного розрідження і гідролізу і після додавання 15 г пресованих пекарських дріжджів (De Danske Spritfabrikker) на кг вихідного СВ.

Розрідження і гідроліз був можливий при вихідному вмісті СВ до 40 % СВ (фіг. 2 і 3). У випадку вихідного вмісту 40 % СВ можна було досягти концентрацією глюкози 80 г·кг⁻¹ через 96 годину. Також можна було здійснювати процес у вигляді SSF (фіг. 3), зменшуючи при цьому інгібування целюлаз продуктами, викликане накопиченням глюкози. Можна було ферментувати гідролізати, містять до 40 % вихідного СВ, використовуючи звичайні пекарські дріжджі. У частково анаеробних умовах вихід етанолу становив 80, 79, 76, 73 і 68 % від теоретично можливого при 20, 25, 30, 35 і 40 % СВ, відповідно.

Приклад 4: Розрідження, оцукрювання і ферментація всього урожаю

Лігноцелюлозну і біомасу, що містить крохмаль можна обробляти одночасно, використовуючи перемішування на основі дії сили ваги і суміші целюлаз, геміцелюлаз і амілаз. Лігноцелюлозні біомаси можуть бути отримані із урожаю сільськогосподарських культур, що складається наприклад зі стебел кукурудзи, соломи, наприклад рису, пшениці, жита, вівса, ячменя, жита, рапсу і сорго, бульби, наприклад буряка, картоплі, зерна, напри-

клад рису, пшениці, жита, вівса, ячменя, жита, рапсу, сорго, деревини, що складається з деревини м'яких порід, наприклад *Pinus sylvestris*, *Pinus radiata*, деревини твердих порід, наприклад *Salix* spp., *Eucalyptus* spp., твердих побутових відходів, макулатури і подібних біомас.

В експериментах використовували реактор для гідролізу, описаний у прикладі 3. Пшеничну соломку (головним чином джерело лігноцелюлози) попередньо обробляли, використовуючи протитетичну водну екстракцію при 180-200 °C протягом 5-10 хв при відносній витраті води і сухої речовини 5:1. Зерно пшениці (головним чином джерело крохмалю) піддавали сухому помелу, використовуючи вальцовий млин Kongskilde. Зерно пшениці і попередньо оброблену соломку із середнім розміром приблизно 40 мм змішували в співвідношенні 1:1 розраховуючи на суху речовину. Вміст СВ доводили до 30-40 % додаванням води. Додавали Cellu-Clast 1.5 FG L і Novozym 188 у співвідношенні 5:1, одержуючи завантаження ферментів 7 FPU на г СВ соломи. Гідроліз крохмалю здійснювали, використовуючи фермент для приготування холодного затопу NS50033 (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark) із завантаженням 3,5 г на кг зерна пшениці. Розрідження і гідроліз здійснювали при 50 °C і pH від 4,8 до 5,0. Через 8 годин температуру знижували до 34 °C і додавали 15 г пресованих пекарських дріжджів (De Danske Spritfabrikker) на кг вихідного СВ. Паралельно проводили експеримент тільки із соломкою при 30 % СВ.

Перемішування соломи із зерном приводило до швидкого початкового накопичення глюкози на стадії розрідження і гідролізу у порівнянні із застосуванням однієї соломи (фіг. 4). Після 96 - годинного розрідження і SSF концентрація етанолу становила 41 г·кг⁻¹ при використанні тільки пшеничної соломи як єдиного субстрату (фіг. 4). В експерименті із соломкою і зерном концентрація етанолу досягала 68 г·кг⁻¹.

Приклад 5: Низькотемпературне розрідження крохмалю або матеріалів, що містять крохмаль. Спосіб згідно із даним винаходом також можна

застосовувати для низькотемпературної обробки очищеного крохмалю або матеріалів, що містять крохмаль (наприклад буряка, картоплі, зернових: рису, пшениці, жита, вівса, ячменя, жита, сорго). Відповідно до приклада 4 попередня обробка зерна не потрібна для розрідження і гідролізу крохмалю. З іншої сторони звичайно застосовують сухий помел для попередньої обробки зерна, що містить крохмаль. Зерно сухого помела із вмістом сухої речовини 20-60 % завантажують у змішувач, що працює за принципом дії сили ваги. Одночасно додають фермент для одержання холодного затопу NS50033 (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark) або альфа-амілазу і глюкамілазу. У такому випадку можливо повне розрідження і оцукрювання крохмалю в процесі, здійснюваному в одному реакторі. Діапазони температур і pH у ході процесу ферментативного гідролізу визначаються ферментами і будуть становити від 25 до 60 °C, краще 40-55 °C, і pH 3-12, краще pH 3-8, відповідно.

Спосіб можна комбінувати з SSF.

Цитована література.

Galbe, M., Zacchi, G. (2002), A review of the production of ethanol from softwood. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59:618-628.

Giovannozza-Sermanni, G., D'Annibale, A., Perani, C, Porri, A., Falesiedi, G. (2002).

Solid-state bioreactors for the sustainability.

<http://www.unifus.it/dipartimenti/dabac/progetti/ssbioreactors/solidstatebioreactor.htm>

Gregg, D., Saddler, J.N. (1995). Bioconversion of lignocellulosic residues to ethanol:

Process flow-sheet development. Biomass Bioenerg. 9:287-302.

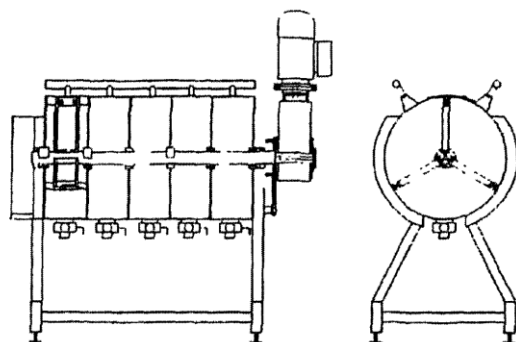
Mais, U., Esteghalalian, A.R, Saddle, J.N. (2002). Influence of mixing regime on enzymatic saccharification of steam-exploded softwood chips. Appl. Biochem.

Biotechnol. 98-100:463-472.

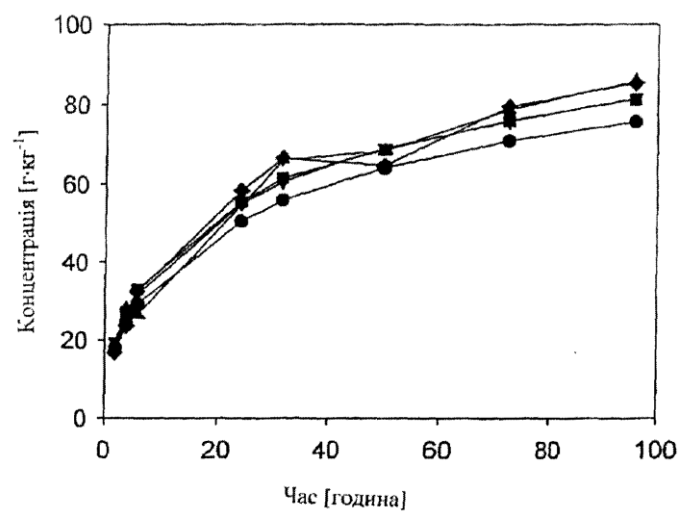
US4409329

US2002117167A

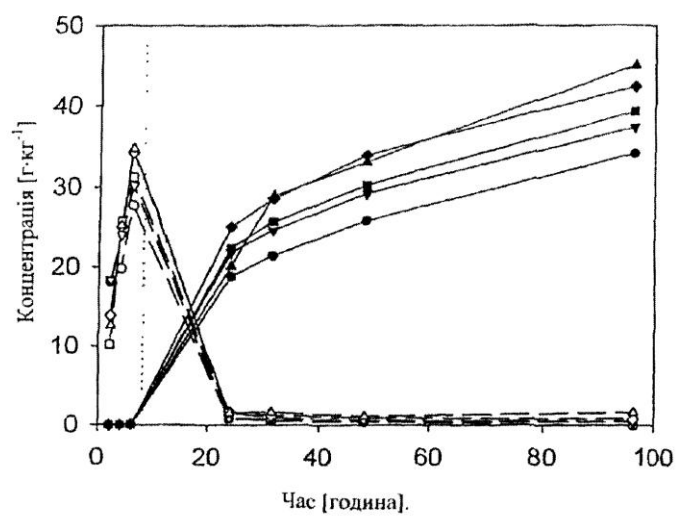
US200400S674A



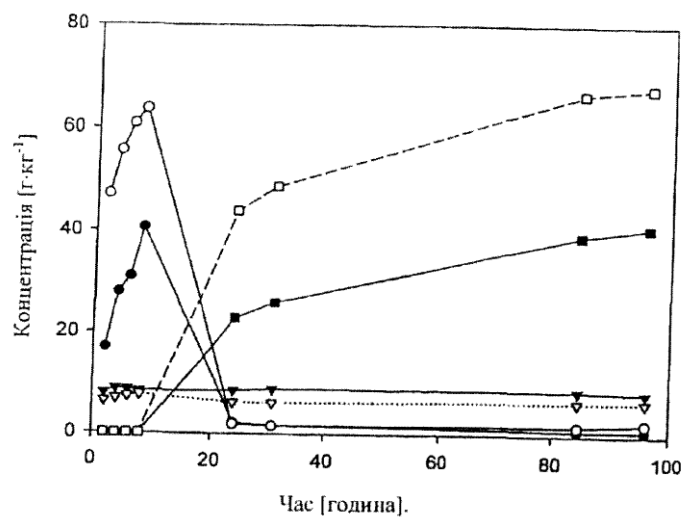
ФІГ. 1



ФІГ. 2



ФІГ. 3



ФІГ. 4