



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120831** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 3/00

C12P 5/00

C12P 7/56 (2006.01)

C12N 11/02 (2006.01)

C12N 11/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2015 01626**
(22) Дата подання заявки: **18.05.2010**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.02.2020**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/180,032, 61/252,293**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **20.05.2009, 16.10.2009**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.06.2015, Бюл.№ 12**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.02.2020, Бюл.№ 4**
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21): **, а201115095, 18.05.2010**
(72) Винахідник(и): **Медофф Маршалл (US), Мастерман Томас (US), Медофф Харрісон (US)**
(73) Власник(и): **КСІЛЕКО, ІНК., 360 Audubon Road, Wakefield, MA 01880, USA (US)**
(74) Представник: **Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2008073186 A2, 19.06.2008
Khan A W et al: "Effect of electron-beam irradiation pretreatment on the enzymatic hydrolysis of softwood", Biotechnology and Bioengineering, US. – 1986. - Vol. 28, №9, - P. 1449-145
Rudolf A et al: "Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using Saccharomyces cerevisiae TMB3400 and Pichia stipitis CBS6054" Biotechnology and Bioengineering 2008030, vol. 99, no. 4, 1 March 2008 P. 783-790.
WO 2008073186 A2, 19.06.2012
US 4405715 A, 20.09.1983
WO 2008000809 A1, 03.01.2008
US 2003187102 A1, 02.10.2003
US 4769082 A, 06.09.1988
Marques S et al: "Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using Pichia stipitis" Biomass and bioenergy, Pergamon, Oxford, GB, vol. 32, no. 5, 01 May 2008, P. 400-406
Beardmore D H et al: "Gamma-ray irradiation as a pre treatment for the enzymatic hydrolysis of cellulose" Biotechnology letters, Kew, Surrey, GB, vol. 2, no. 10, 1 October 1980, P. 435-438
Lepifre S et al: "Lignin incorporation combined with electron-beam irradiation improves the surface water resistance of starch films" Biomacromolecules, vol. 5, no. 5, September 2004, P. 1678-1686
Borjesson et al: "Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose" enzyme and microbial technology, Stoneham, MA, US, vol. 41, no. 1-2, 10 May 2007, P. 186-195

UA 120831 C2

(54) ОБРОБКА БІОМАСИ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу ферментації низькомолекулярного цукру, який включає контакт низькомолекулярного цукру в середовищі з листом, що містить окислені волокна біомаси і ферментуючий мікроорганізм, іммобілізований на волокнах; і ферментацію низькомолекулярного цукру в умовах, придатних для конверсії вказаного цукру в органічну кислоту ферментуючим мікроорганізмом; причому волокна біомаси окислені в окислювальному середовищі способом окислення, вибраним з групи, яка складається з опромінення дозою, що становить від 5 до 60 Мрад, хімічного окислення при рівні рН нижче приблизно 5,5, ультразвукової обробки і піролізу.

Дана заявка встановлює пріоритет тимчасової патентної заявки США № 12/417840, поданої 04 квітня 2009 р., тимчасової патентної заявки США № 61/180032, поданої 20 травня 2009 р., і тимчасової патентної заявки США № 61/252293, поданої 16 жовтня 2009 р. Повний опис кожної з даних тимчасових заявок включений за допомогою посилання в даний документ.

5 Рівень техніки

Целюлозні і лігноцелюлозні матеріали виробляють, переробляють і використовують в численних застосуваннях. Часто ці матеріали використовують однократно і потім викидають у вигляді сміття або просто розглядають як відходи, включаючи, наприклад, стоки, вичавки, тирсу і солому.

10 Різноманітні целюлозні і лігноцелюлозні матеріали, їх використання і застосування описані в патентах США №№ 7307108, 7074918, 6448307, 6258876, 6207729, 5973035 і 5952105, а також в різних патентних заявках, включаючи опубліковані патентні заявки США № 2006/010648 "Волокнисті матеріали і композити" (поданої 23 березня 2006 р.) і № 2007/0045456 "Волокнисті матеріали і композити".

15 Суть винаходу

У деяких випадках присутність біомаси в процесі, наприклад, ферментації, сприяє перетворенню низькомолекулярного цукру в проміжний або кінцевий продукт. Автори даного винаходу виявили, що включення біомаси в суміші з низькомолекулярним цукром в середовищі, наприклад, розчинника або системи розчинників і мікроорганізмами може підвищити вихід і швидкість виробництва проміжного або кінцевого продукту, що отримується шляхом конверсії цукру, наприклад, спирту, в тому числі етанолу або бутанолу. Включення біомаси може також запобігати неповній, повільній або "застиглій" конверсії продукту, наприклад, шляхом ферментації.

25 Біомаса може сама не перетворюватися в продукт (наприклад, спирт) або може частково або повністю перетворюватися в продукт разом з низькомолекулярним цукром.

У тих випадках, де біомаса частково конвертується, питома поверхня, і пористість біомаси збільшуються, відповідно, відносно питомої поверхні і пористості вихідної біомаси, що може вигідно збільшувати швидкість перетворення низькомолекулярного цукру в продукт.

30 У деяких випадках біомаса може являти собою залишки целюлозного або лігноцелюлозного матеріалу, який був оцукрений, наприклад, лігнін і/або інші матеріали, які залишаються після того, як целюлоза була конвертована в цукор.

У одному аспекті даний винахід стосується способу, який включає використання мікроорганізму і/або ферменту, який іммобілізований на матеріалі біомаси, включаючи, наприклад, функціоналізовані волокна біомаси, щоб конвертувати вуглевод, наприклад, низькомолекулярний цукор, в продукт. Термін "іммобілізований" означає, що мікроорганізм і/або фермент пов'язаний з волокнами безпосередньо або опосередковано (наприклад, через хімічний лінкер), ковалентними, водневими, іонними або еквівалентними зв'язками, і/або механічною взаємодією, наприклад, між мікроорганізмом і порами матеріалу біомаси, наприклад, волокон. Зв'язок можна створювати, наприклад, електричною поляризацією матеріалу біомаси. Дана взаємодія може бути постійною, напівпостійною або короточасною. Механічна взаємодія може включати поміщення або прикріплення мікроорганізму або ферменту в порах або інших місцях матеріалу біомаси.

Деякі варіанти здійснення включають одну або більше з наступних відмітних особливостей.

45 Конверсія може включати можливість мікроорганізму конвертувати щонайменше частину низькомолекулярного цукру в спирт, наприклад, етанол або бутанол, або у вуглеводень або водень. Конверсія може включати ферментацію. Мікроорганізм може включати дріжджі, наприклад, *Saccharomyces cerevisiae* (пекарські дріжджі) і/або *Pichia stipitis*, або бактерії, наприклад, *Zytoponas mobilis*. Спосіб може додатково включати опромінення волокон біомаси, наприклад, іонізуючим випромінюванням, наприклад, з використанням пучка частинок. Волокна біомаси можуть мати питому поверхню по методу Брунауера-Еммета-Теллера (BET), що складає більше ніж $0,25 \text{ м}^2/\text{г}$, і/або пористість, що становить щонайменше 70 %. Волокна біомаси можна стримувати з матеріалу біомаси, який містить внутрішні волокна і який нарізаний до такого стану, що його внутрішні волокна відкриваються в істотній мірі.

50 У іншому аспекті даний винахід стосується суміші, яка включає матеріал біомаси, який має полярні функціональні групи, мікроорганізм, що має комплементарні притягуючі функціональні групи, і рідке середовище.

У наступному аспекті даний винахід стосується композиції, що включає волокна біомаси, які мають функціональні групи, і мікроорганізм, що має комплементарні притягуючі функціональні групи, причому мікроорганізм є іммобілізованим на волокнах біомаси.

Даний винахід також стосується способу, який включає конверсію низькомолекулярного цукру або матеріалу, який включає низькомолекулярний цукор в суміші з біомасою, мікроорганізмом і розчинником або системою розчинників, наприклад, водою або сумішшю води і органічного розчинника, в продукт. Приклади розчинників або систем розчинників включають

5 веду, гексан, гексадекан, гліцерин, хлороформ, толуол, етилацетат, петролейний ефір, зріджений нафтовий газ (ЗНГ), іонні рідини і їх суміші. Розчинник або система розчинників може знаходитися у вигляді однієї фази, двох або більше фаз. Біомаса може існувати, наприклад, у волокнистій формі.

10 У деяких випадках, наявність матеріалу біомаси (наприклад, обробленої яким-небудь способом, описаним в даному документі, або необробленим) в процесі виробництва продукту може підвищити швидкість виробництва даного продукту. Без наміру слідувати якій-небудь певній теорії, вважають, що наявність твердої речовини, наприклад, що має високу питому поверхню і/або високу пористість, може збільшувати швидкості реакцій шляхом збільшення ефективної концентрації розчинених речовин і створення субстрату, на якому можуть

15 відбуватися реакції.

У деяких варіантах здійснення матеріал біомаси, який був опромінений, окиснений, хімічно оброблений, механічно оброблений, оброблений ультразвуком, оброблений паровим вибухом і/або підданий піролізу, можна вводити в процес ферментації низькомолекулярного цукру, наприклад, щоб підвищити швидкість і вихід ферментації.

20 Наприклад, опромінений або неопромінений матеріал біомаси, наприклад, паперове волокно, можна вводити в процес ферментації, наприклад в процес ферментації кукурудзи з утворенням етанолу або в процес ферментації екстракту цукрової тростини, щоб підвищити швидкість виробництва щонайменше на 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100 % або більше, наприклад, щонайменше на 150 % або навіть до 1000 %. Конверсія, наприклад, ферментація, може

25 виявляти процентну ефективність, як визначено в розділі "Приклади" даного документа, яка складає, наприклад, щонайменше 140 %, в деяких випадках щонайменше 170 %.

Матеріал біомаси може мати високу питому поверхню, високу пористість і/або низьку об'ємну густину. У деяких варіантах здійснення біомаса присутня в суміші в кількості, що складає від приблизно 0,5 мас. % до приблизно 50 мас. %, наприклад, від приблизно 1 мас. %

30 до приблизно 25 мас. % або від приблизно 2 мас. % до приблизно 12,5 мас. %. У інших варіантах здійснення біомаса присутня в кількостях, що складають більше ніж приблизно 0,5 мас. %, наприклад, більше ніж приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або навіть більше ніж приблизно 10 мас. %.

Оскільки сам матеріал біомаси не витрачається в процесі конверсії, матеріал біомаси можна повторно використовувати в багаторазових періодичних процесах або можна використовувати безперервно у виробництві великих об'ємів продукту.

Деякі варіанти здійснення включають одну або більше з наступних відмітних особливостей. Спосіб може включати опромінення волокнистої біомаси перед змішуванням, наприклад, за допомогою іонізуючого випромінювання, повна доза якого складає, наприклад, щонайменше 5

40 Мрад. Опромінення можна здійснювати з використанням пучка частинок. Опромінення можна провести в умовах, вибраних для зменшення молекулярної маси біомаси. Опромінення можна здійснювати з багаторазовим застосуванням випромінювання. Іонізуюче випромінювання може включати випромінювання електронного пучка. Наприклад, випромінювання можна застосовувати при повній дозі, що складає від приблизно 10 Мрад до приблизно 150 Мрад,

45 наприклад, при потужності дози, що складає від приблизно 0,5 до приблизно 10 Мрад/добу або від 1 Мрад/с до приблизно 10 Мрад/с. У деяких варіантах здійснення опромінення включає застосування двох або більше джерел випромінювання, включаючи гамма-випромінювання і пучок електронів.

У деяких варіантах здійснення опроміненню піддають вихідний матеріал біомаси, в той час як вихідний матеріал біомаси знаходиться в атмосфері повітря, азоту, кисню, гелію або аргону. У деяких варіантах здійснення попередня обробка може включати попередню обробку вихідного матеріалу біомаси паровим вибухом.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає механічну обробку біомаси, наприклад, шляхом зменшення одного або більше розмірів окремих шматків біомаси, наприклад, нарізанням, помелом жорнами, механічним різанням або розриванням, стрижневим подрібненням, мокрим або сухим помелом, повітряним дисковим помелом, рубанням, пресуванням, ущільненням або поєднаннями будь-яких даних способів. У деяких випадках після механічної обробки біомаса включає волокна, що мають середнє відношення довжини до діаметра, що складає більше ніж 5/1. У деяких варіантах здійснення приготування біомаса може

60 мати питому поверхню по методу BET, що складає більше ніж 0,25 м²/г. Механічно оброблена

біомаса може мати об'ємну густину, що складає менше ніж приблизно $0,5 \text{ г/см}^3$, наприклад, менше ніж $0,35 \text{ г/см}^3$.

У будь-якому із способів, описаних в даному документі, можна використовувати випромінювання із склепінчастого пристрою.

Якщо не визначена інша умова, всі технічні і наукові терміни, що використовуються в даному документі, мають такі ж значення, які звичайно розуміє фахівець в галузі техніки, до якої належить даний винахід. Хоча способи і матеріали, які аналогічні або еквівалентні тим, які описані в даному документі, можна використовувати в практичному здійсненні або випробуванні даного винаходу, прийнятні способи і матеріали описані нижче. Всі публікації, патентні заявки, патенти і інші матеріали, посилання на які приведені в даному документі, у всій своїй повноті включені в нього за допомогою посилання. У разі суперечності переважаюча дія має даний опис, включаючи визначення. Крім того, матеріали, способи і приклади є тільки ілюстративними і не призначені як обмежувальні.

Інші відмітні особливості і переваги даного винаходу стануть очевидними з наступного докладного опису і з формули винаходу.

Опис креслень.

Фіг. 1 представляє блок-схему, що ілюструє обробку біомаси і використання обробленої біомаси в процесі ферментації.

Фіг. 2 представляє схематичне зображення функціоналізованої біомаси, яка взаємодіє з мікроорганізмом.

Фіг. 3 представляє інфрачервоний спектр крафт-картону, нарізаного різальною машиною з обертовим ножом.

Фіг. 4 представляє інфрачервоний спектр крафт-картону згідно з фіг. 3 після опромінення дозою 100 Мрад гамма-випромінювання.

Фіг. 5A-5I представляють спектри ЯМР ^1H зразків P132, P132-10, P132-100, P-1e, P-5e, P-10e, P-30e, P-70e і P-100e в прикладі 13. Фіг. 5J представляє порівняння обмінюваного протона при $\sim 16 \text{ м. ч.}$ згідно з фіг. 5A-5I. Фіг. 5K представляє спектр ЯМР ^{13}C зразка P-100e. Фіг. 5L-5M представляють спектр ЯМР ^{13}C зразка P-100e, в якому затримки становлять 10 секунд. Фіг. 5N представляє ЯМР ^1H зразка P-100e при концентрації 10 мас. %.

Докладний опис

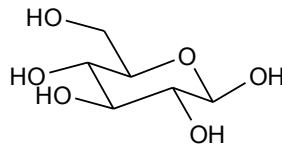
Функціоналізований матеріал біомаси, що має бажані типи і кількості функціональних груп, включаючи карбоксильні групи, енольні групи, альдегідні групи, кетонні групи, нітрильні групи, нітрогрупи, або нітрозогрупи, можна отримати, використовуючи способи, описані в даному документі. Такі функціоналізовані матеріали можуть сприяти конверсії низькомолекулярного цукру в продукт, наприклад, в процесі ферментації.

Типи біомаси

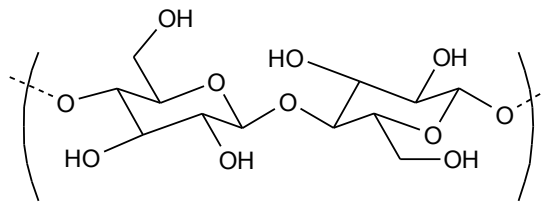
Переважні матеріали біомаси для використання в процесах, описаних в даному документі, містять волокна, які можуть функціоналізувати з функціональними групами, що є комплементарними для функціональних груп агентів, які будуть використані в конверсії цукру, наприклад, мікроорганізмів, в тому числі дріжджів.

Джерела волокна включають джерела целюлозного волокна, включаючи папір і паперові вироби (наприклад, папір з багат шаровим покритим і крафт-папір), і джерела лігноцелюлозного волокна, включаючи деревину і матеріали, що містять деревину, наприклад, деревностружкові плити. Інші прийнятні джерела волокна включають джерела натурального волокна, наприклад, трави, рисове лушпиння, вижимки, джут, коноплі, льон, бамбук, мексиканська агава, манільське прядиво, солома, просо лозиноподібне, люцерна, сіно, стрижні кукурудзяних качанів, кукурудзяна солома, кокосові волокна; джерела волокна з високим вмістом α -целюлози, наприклад, бавовна; і джерела синтетичного волокна, наприклад, екструдована пряжа (орієнтована пряжа або неорієнтована пряжа). Джерела натурального або синтетичного волокна можна отримати з обривків, невживаних текстильних матеріалів, наприклад, залишків, або вони можуть являти собою вживані відходи, наприклад, дрантя. Коли паперові вироби використовують як джерела волокна, вони можуть являти собою, невживані матеріали, наприклад, обривки невживаних матеріалів, або вони можуть являти собою вживані відходи. Крім невживаних вихідних матеріалів, вживані, промислові (наприклад, побічні продукти переробки) і технології відходи (наприклад, стоки від переробки паперу) можна також використовувати як джерела волокна. Крім того, джерела волокна можна отримувати або витягувати з відходів життєдіяльності людини (наприклад, стоків) і відходів тваринного або рослинного походження. Додаткові джерела волокна описані в патентах США №№ 6448307, 6258876, 6207729, 5973035 і 5952105.

У деяких варіантах здійснення матеріал біомаси включає вуглевод, який являє собою або включає матеріал, що містить один або більше β -1,4-зв'язків і має середньочисельну молекулярну масу, що складає приблизно від 3000 до 50000. Такий вуглевод являє собою або включає целюлозу (I), яка отримана з β -глюкози (1) за допомогою конденсації β (1,4)-глікозидних зв'язків. Цей зв'язок відрізняється від α (1,4)-глікозидних зв'язків, присутніх в крохмалі і інших вуглеводах.



1



I

Крохмальні матеріали включають сам крохмаль, наприклад, кукурудзяний крохмаль, пшеничний крохмаль, картопляний крохмаль або рисовий крохмаль, похідне крохмалю, або матеріал, який включає крохмаль, в тому числі їстівний харчовий продукт або сільськогосподарський продукт. Наприклад, крохмальним матеріалом може бути арахача, гречка, банан, ячмінь, маніока, кудзу, квасениця бульбова, саго, сорго, звичайна картопля, солодка картопля, таро, ямс або одне, або більше з бобових рослин, в тому числі боби, сочевиця або горох. Суміші будь-яких двох або більше крохмальних матеріалів також являють собою крохмальні матеріали.

У деяких випадках біомаса являє собою мікробний матеріал. Мікробні джерела включають, але не обмежуються цим, що будь-який мікроорганізм або організм, що зустрічається в природі або генетично модифікований, який містить або здатний забезпечувати джерело вуглеводів (наприклад, целюлоза), наприклад, протисти (одноклітинні), наприклад, тваринні протисти (наприклад, найпростіші, в тому числі джгутикові, амeboподібні, інфузорії і споровики) і рослинні протисти (наприклад, водорості, в тому числі комірчасті, хлорарахіофіти, криптонади, евгленіди, глаукофіти, гаптофіти, червоні водорості, страменофіли і зелені рослини). Інші приклади включають морські водорості, планктон (наприклад, макропланктон, мезопланктон, мікропланктон, нанопланктон, пікопланктон, і фемптопланктон), фітопланктон, бактерії (наприклад, грамозитивні бактерії, грамнегативні бактерії і екстремофіли), дріжджі і/або їх суміші. У деяких випадках мікробну біомасу можна отримати з натуральних джерел, наприклад, океанів, озер, інших водоймищ, що містять, наприклад, солону воду або прісну воду, або на суші. Як альтернатива або додатково, мікробну біомасу можна отримати з систем культур, наприклад, крупномасштабний сухих і вологих систем культур.

Суміші будь-яких матеріалів біомаси, описаних в даному документі, можна використовувати для виготовлення проміжних або кінцевих продуктів, описаних в даному документі. Наприклад, суміші целюлозних матеріалів і крохмальних матеріалів можна використовувати для виготовлення будь-якого продукту, описаного в даному документі.

Системи для обробки біомаси і використання обробленої біомаси в ферментації

Фіг. 1 представляє систему 100 для обробки біомаси, зокрема, волокнистої біомаси, і подальшого використання обробленої біомаси для прискорення процесу ферментації. Система 100 включає модуль 102, в якому вихідний матеріал біомаси механічно обробляють, наприклад, відкриваючи внутрішні волокна вихідного матеріалу. Далі приклади видів механічної обробки будуть детально описані. Система 100 також включає модуль 104, в якому механічно оброблений вихідний матеріал функціоналізують, наприклад, за допомогою опромінення. Після функціоналізації функціоналізовані волокна спрямовують в систему ферментації 106 транспортним модулем 108.

Функціоналізовані волокна потім присутні в процесі ферментації і прискорюють процес ферментації, забезпечуючи субстрат, який може взаємодіяти з мікроорганізмами, що

використовуються в ферментації, наприклад, клітинами дріжджів. Ця взаємодія схематично представлена на фіг. 2, яка зображує функціоналізоване полярне волокно 10 і клітину дріжджів 12, що має комплементарну полярну функціональну групу. Внаслідок полярності волокон і клітини дріжджів, клітина може виявитися іммобілізованою на одному або більшому числі волокон. Зв'язування клітини дріжджів (або іншого мікроорганізму) з волокнами може здійснюватися за допомогою водневого зв'язку, ковалентного або іонного зв'язку. У деяких випадках функціональні групи на волокнах можуть реагувати з групами на мікроорганізмі, утворюючи ковалентний зв'язок. Підвищена питома поверхня і пористість матеріалу біомаси, які виникають в результаті механічної обробки (наприклад, в модулі 102), забезпечують збільшення питомої поверхні для взаємодії волокна і мікроорганізму і, таким чином, посилюючи цю взаємодію. Іммобілізовані клітини є більш продуктивними, збільшуючи ефективність і вихід процесу ферментації і запобігаючи передчасному "застиганню" процесу.

Потрібно зазначити, що якщо перемішування здійснюють в процесі ферментації, перемішування переважно є відносно м'яким (з низьким зусиллям зсуву), щоб зводити до мінімуму порушення взаємодії між мікроорганізмами і волокнами. У деяких варіантах здійснення використовують струминне перемішування, як описано в патентних заявках СШП № 61/218832 і № 61/179995, повні описи яких включені в даний документ за допомогою посилання.

При повторному розгляді фіг. 1, видно, що при ферментації утворюється неочищена суміш на основі етанолу, яка втікає в резервуар для зберігання 110. Вода або інший розчинник, а також інші неетанольні компоненти відганяють з неочищеної суміші етанолу, використовуючи відгінну колону 112, і етанол потім переганяють, використовуючи дистиляційний блок 114, наприклад, ректифікаційну колону. Нарешті, етанол можна сушити, використовуючи молекулярне сито 116, денатурувати по мірі необхідності і спрямовувати на транспортування бажаним способом.

У деяких випадках системи, описані в даному документі, або їх компоненти, можуть бути портативними, щоб систему можна було перевозити (наприклад, залізничним, автомобільним або водним транспортом) з одного місця в інше. Стадії способу, описаного в даному документі, можна здійснювати в одному або декількох місцях, і в деяких випадках одну або більше стадій можна здійснювати в процесі транспортування. Така мобільна обробка описана в патентній заявці США № 12/374549 і в міжнародній патентній заявці № WO 2008/011598, повні описи яких включені в даний документ за допомогою посилання.

Будь-які або всі стадії способу, описаного в даному документі, можна здійснювати при температурі навколишнього середовища. При бажанні охолодження і/або нагрівання можна використовувати протягом певних стадій. Наприклад, вихідний матеріал можна охолоджувати в процесі механічної обробки, щоб збільшити його крихкість. У деяких варіантах здійснення охолодження використовують до, під час або після початкової механічної обробки і/або подальшої механічної обробки. Охолодження можна здійснювати згідно з описом в патентній заявці США № 12/502,629, повний опис якої включений в даний документ за допомогою посилання. Крім того, температуру в системі ферментації 106 можна регулювати, щоб прискорити ферментацію.

Фізична обробка

Процеси фізичної обробки, які можна використовувати для зміни морфології матеріалу біомаси і/або функціоналізації матеріалу, можуть включати один або більше з тих, які описані в даному документі, в тому числі механічну обробку, хімічну обробку, опромінення, ультразвуков) обробку, окиснення, піроліз або паровий вибух. Способи обробки можна використовувати у вигляді поєднання двох, трьох, чотирьох навіть всіх даних технологій (в будь-якому порядку). Коли використовують більше ніж один спосіб обробки, ці способи можна використовувати в один і той же час або в різні терміни. Інші способи, які функціоналізують вихідний матеріал біомаси і/або змінюють його морфологію, можна також використовувати як індивідуально, так і в поєднанні зі способами, описаними в даному документі.

Механічна обробка

У деяких випадках, способи можуть включати механічну обробку вихідного матеріалу біомаси. Види механічної обробки включають, наприклад, різання, подрібнення, пресування, дроблення, деформування і рубання. Подрібнення може включати, наприклад, кульовий, молотковий, роторний/статорний сухий або мокрий помел, або інші види подрібнення. Інші види механічної обробки включають, наприклад, подрібнення жорнами, розтріскування, механічне різання або розривання, стрижневе шліфування або повітряний дисковий помел.

Механічна обробка може мати перевагу для "підготовки", "розтягнення", подрібнення і дроблення целюлозних або лігноцелюлозних матеріалів, роблячи целюлозу матеріалів більш

сприйнятливою до розщеплення ланцюга і/або зменшення ступеня кристалічності. Підготовлені матеріали можуть також бути більш сприйнятливими до окиснення у випадку опромінення.

У деяких випадках, механічна обробка може включати початкову підготовку отриманого вихідного матеріалу, наприклад, подрібнення матеріалів, в тому числі за допомогою різання, дроблення, помелу, розпилення або рубання. Наприклад, в деяких випадках, пухкий вихідний матеріал (наприклад, вторинний папір, крохмальні матеріали або просо лозиноподібне) готують різанням або подрібненням.

Як альтернатива або додатково, вихідний матеріал можна спочатку фізично обробляти одним або декількома з числа інших фізичних способів обробки, включаючи, наприклад, хімічну обробку, випромінювання, ультразвукову обробку, окиснення, піроліз або паровий вибух, і потім механічно обробляти. Така послідовність може мати перевагу, оскільки матеріали, оброблені одним або більше способами, включаючи, наприклад, опромінення або піроліз, схильні до більшої крихкості і, отже, може виявитися більш легким внесення подальших змін в молекулярну структуру матеріалу за допомогою механічної обробки.

У деяких варіантах здійснення матеріал біомаси є волокнистим, і механічна обробка включає різання, щоб відкрити волокна волокнистого матеріалу. Різання можна здійснювати, наприклад, використовуючи пристрій для різання з дисковими лезами. Інші способи механічної обробки біомаси включають, наприклад, помел або дроблення. Помел можна здійснювати, використовуючи, наприклад, молотковий млин, кульовий млин, колоїдний млин, конічний або конусний млин, дисковий млин, бігунковий млин, млин марки Wiley або зерновий млин. Дроблення можна здійснювати, використовуючи, наприклад, жорнову дробарку, стрижневу дробарку, кавову дробарку або жорновий млин. Дроблення можна здійснювати, наприклад, за допомогою зворотно-поступального стрижня або іншого елемента, як у випадку стрижневого млина. Інші механічні способи обробки включають механічне різання або розривання, інші способи, в яких до матеріалу прикладають тиск, і повітряний дисковий помел. Прийнятні види механічної обробки додатково включають будь-які інші способи, які змінюють молекулярну структуру або морфологію матеріалу біомаси.

При бажанні механічно оброблений матеріал можна пропускати через сито, наприклад, яке має середній розмір отворів, що становить 1,59 мм або менше (1/16 дюйма, 0,0625 дюйма). У деяких варіантах здійснення різання або іншу механічну обробку і просіювання здійснюють одночасно. Наприклад, різак з дисковими лезами можна використовувати для одночасного різання і просіювання матеріалу біомаси. Біомаса ріжеться між нерухомим: і лезами і обертовими лезами, виробляючи подрібнений матеріал, який проходить крізь сито і збирається в бункері.

Матеріал біомаси можна механічно обробляти в сухому стані (наприклад, при невеликому або нульовому вмісті води на його поверхні), гідратованому стані (наприклад, при вмісті до 10 мас. % абсорбованої води) або у вологому стані, наприклад, при вмісті від приблизно 10 мас. % до приблизно 75 мас. % води. Матеріал біомаси можна навіть механічно обробляти в стані часткового або повного занурення в рідину, включаючи воду, етанол або ізопропанол. Матеріал біомаси можна також механічно обробляти в середовищі газу (наприклад, в потоці або атмосфері газу, який не є повітрям), наприклад, кисню або азоту, або пари.

Механічна обробка системи може бути пристосована для утворення потоків з певними морфологічними характеристиками, включаючи, наприклад, питому поверхню, пористість, об'ємну густину і, у випадку волокнистих вихідних матеріалів, характеристики волокна, в тому числі відношень я довжини до ширини.

У деяких варіантах здійснення питома поверхня по методу BET механічно обробленого матеріалу складає більше ніж 0,1 м²/г, наприклад, більше ніж 0,25 м²/г, більше ніж 0,5 м²/г, більше ніж 1,0 м²/г, більше ніж 1,5 м²/г, більше ніж 1,75 м²/г, більше ніж 5,0 м²/г, більше ніж 10 м²/г, більше ніж 25 м²/г, більше ніж 35 м²/г, більше ніж 50 м²/г, більше ніж 60 м²/г, більше ніж 75 м²/г, більше ніж 100 м²/г, більше ніж 150 м²/г, більше ніж 200 м²/г, або навіть більше ніж 250 м²/г.

Пористість механічно обробленого матеріалу може складати, наприклад, більше ніж 20 %, більше ніж 25 %, більше ніж 35 %, більше ніж 50 %, більше ніж 60 %, більше ніж 70 %, більше ніж 80 %, більше ніж 85 %, більше ніж 90 %, більше ніж 92 %, більше ніж 94 %, більше ніж 95 %, більше ніж 97,5 %, більше ніж 99 % або навіть більше ніж 99,5 %.

У деяких варіантах здійснення після механічної обробки матеріал має об'ємну густину, що складає менше ніж 0,25 г/см³, наприклад, 0,20 г/см³, 0,15 г/см³, 0,10 г/см³, 0,05 г/см³ або менше, наприклад, 0,025 г/см³. Об'ємну густину визначають, використовуючи американський стандартний метод випробувань ASTM D1895B. Коротко, цей спосіб включає наповнення зразком мірного циліндра відомого об'єму і вимірювання маси даного зразка. Об'ємну густину

обчислюють розподілом маси зразка в грамах на відомий об'єм циліндра в кубічних сантиметрах.

5 Якщо біомаса являє собою волокнистий матеріал, волокна механічно обробленого матеріалу можуть мати відносно велике середнє відношення довжини до діаметра (наприклад, більше ніж 20/1), навіть якщо їх різали більше ніж однократно. Крім того, волокна волокнистих матеріалів, описаних в даному документі, можуть мати відносно вузький розподіл довжини і/або відношення довжини до діаметра.

10 При використанні в даному документі середні значення ширини волокна (наприклад, діаметри) являють собою значення, визначені оптичним способом при випадковому виборі приблизно 5000 волокон. Середні значенні довжини волокна являють собою виправлені значення зваженої по довжині довжини. Значення питомої поверхні по методу BET являють собою багатоточкові значення питомої поверхні, і значення пористості являють собою значення, визначені методом ртутної порометрії.

15 Якщо біомаса являє собою волокнистий матеріал, середнє відношення довжини до діаметра волокна механічно обробленого матеріалу може складати, наприклад, більше ніж 8/1, наприклад, більше ніж 10/1, більше ніж 15/1, більше ніж 20/1, більше ніж 25/1 або більше ніж 50/1. Середня довжина волокна механічно обробленого матеріалу може складати, наприклад, приблизно від 0,5 мм до 2,5 мм, наприклад, приблизно від 0,75 мм до 1,0 мм, і середня ширина (наприклад, діаметр) другого волокнистого матеріалу 14 може складати, наприклад, приблизно від 5 мкм до 50 мкм, наприклад, приблизно від 10 мкм до 30 мкм.

20 У деяких варіантах здійснення, якщо біомаса являє собою волокнистий матеріал, стандартне відхилення довжини волокна механічно обробленого матеріалу може складати менше ніж 60 % середньої довжини волокна механічно обробленого матеріалу, наприклад, менше ніж 50 % середньої довжини, менше ніж 40 % середньої довжини, менше ніж 25 % середньої довжини, менше ніж 10 % середньої довжини, менше ніж 5 % середньої довжини, або навіть менше ніж 1 процент середньої довжини.

У деяких ситуаціях може виявитися бажаним приготування матеріалу з низькою об'ємною густиною, ущільнення матеріалу (наприклад, щ(б зробити його транспортування в інше місце простішим і таким, що менше коштує) і подальше повернення матеріалу в стан із зниженою об'ємною густиною. Ущільнені матеріали можна обробляти будь-яким зі способів, описаних в даному документі, або будь-який матеріал, оброблений будь-яким із способів, описаних в даному документі, можна потім ущільнювати, наприклад, як описано в патентній заявці США № 12/429045 і в міжнародній патентній заявці № WO 2008/073186, повні описи яких включені в даний документ за допомогою посилання.

35 Обробка випромінюванням

Одну або більше методик обробки випромінюванням можна використовувати для обробки біомаси, наприклад, для функціоналізації матеріалу. Випромінюванням можна також стерилізувати матеріали або будь-яке середовище, необхідне для біологічної обробки матеріалу.

40 У деяких варіантах здійснення на матеріал впливає енергія, яка вибиває електрон з його атомної орбіталі і використовується для опромінення матеріалів. Випромінювання можуть створювати (1) важкі заряджені частинки, в тому числі альфа-частинки або протони, (2) електрони, що утворюються, наприклад, при бета-розпаді або в прискорювачах електронного пучка, або (3) електромагнітне випромінювання, наприклад, гамма-випромінювання, рентгенівське випромінювання або ультрафіолетове випромінювання. У одному підході випромінювання, що виробляється радіоактивними речовинами, можна використовувати для опромінення вихідного матеріалу. У іншому підході електромагнітне випромінювання (наприклад, отримане за допомогою генераторів електронного пучка) можна використовувати для опромінення вихідного матеріалу. У деяких варіантах здійснення можна використовувати будь-яке поєднання способів (1)-(3), що застосовуються в будь-якому порядку або одночасно. Використовувані дози опромінення залежать від необхідного ефекту і конкретного вихідного матеріалу.

У деяких випадках, коли бажано розщеплення ланцюга і/або бажана функціоналізація ланцюга полімеру, можна використовувати більш важкі частинки, ніж електрони, в тому числі протони, ядра гелію, іони аргону, іони кремнію, іони неону, іони вуглецю, іони фосфору, іони кисню або іони азоту. Коли бажано розщеплення ланцюга з розкриттям циклу, можна використовувати позитивно заряджені частинки внаслідок їх властивостей кислоти Льюїса для прискорення розщеплення ланцюга з розкриттям циклу. Наприклад, коли потрібне максимальне окиснення, можна використовувати іони кисню, і коли потрібно максимальне нітрування, можна використовувати іони азоту. Використання важких частинок і позитивно заряджених частинок

описане в патентній заявці США № 12/417699, повний опис якої включення в даний документ за допомогою посилання.

У одному способі перший матеріал, який являє собою або включає целюлозу, що має середньочисельну молекулярну масу (MN1), опромінюють, наприклад, шляхом впливу іонізуючого випромінювання (наприклад, у вигляді гамма-випромінювання, рентгенівського випромінювання, ультрафіолетового (УФ) світла з довжиною хвилі від 100 нм до 280 нм, пучка електронів або інших заряджених частинок), щоб отримати другий матеріал, який включає целюлозу, що має другу середньочисельну молекулярну масу (MN2), яка складає менше ніж перша середньочисельна молекулярна маса. Другий матеріал (або перший і другий матеріали) можна поєднувати з мікроорганізмом (із застосуванням або без застосування ферментативної обробки), який може використовувати другий і/або перший матеріал або цукор, що міститься в йому або лігнін для отримання проміжного або кінцевого продукту, в тому числі тих, які описані в даному документі.

Оскільки другий матеріал включає целюлозу, що має меншу молекулярну масу в порівнянні з першим матеріалом, і в деяких випадках, також і менший ступінь кристалічності, другий матеріал звичайно краще диспергується, набухає і/або розчиняється, наприклад, в розчині, що містить мікроорганізм і/або фермент. Ці властивості роблять другий матеріал легше оброблюваним і більш сприйнятливим до хімічного, ферментативного і/або біологічного впливу в порівнянні з першим матеріалом, що може значно підвищувати швидкість виробництва і/або рівень виробництва цільового продукту, наприклад, етанолу.

У деяких варіантах здійснення друга середньочисельна молекулярна маса (MN2) нижча, ніж перша середньочисельна молекулярна маса (MN1) більше ніж на приблизно 10 %, наприклад, більше ніж на приблизно 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 %, 60 % або навіть більше ніж на приблизно 75 %.

У деяких випадках другий матеріал включає целюлозу, яка має кристалічність (C2), яка нижча, ніж кристалічність (C1) целюлози першого матеріалу. Наприклад, значення C2 може бути нижчим, ніж значення C1 більше ніж на приблизно 10 %, наприклад, більше ніж на приблизно 15, 20, 25, 30, 35, 40 або навіть більше ніж на приблизно 50 %.

У деяких варіантах здійснення вихідний індекс кристалічності (до опромінення) складає від приблизно 40 до приблизно 87,5 %, наприклад, від приблизно 50 до приблизно 75 % або від приблизно 60 до 70 %, і індекс кристалічності після опромінення складає від приблизно 10 до 50 %, наприклад, від приблизно 15 до приблизно 45 % або від приблизно 20 до приблизно 40 %. Однак в деяких варіантах здійснення, наприклад, після високої дози опромінення, можна отримати індекс кристалічності, що складає менше ніж 5 %. У деяких варіантах здійснення матеріал після опромінення є практично аморфним.

У деяких варіантах здійснення вихідна середньочисельна молекулярна маса (до опромінення) складає від приблизно 200000 до приблизно 3200000, наприклад, від приблизно 250000 до приблизно 1000000 або від приблизно 250000 до приблизно 700000, і середньочисельна молекулярна маса після опромінення складає від приблизно 50000 до приблизно 200000, наприклад, від приблизно 60000 до приблизно 150000 або від приблизно 70000 до приблизно 125000. Однак в деяких варіантах здійснення, наприклад, після високої дози опромінення, можна отримати середньочисельну молекулярну масу, що складає менше ніж приблизно 10000 або навіть менше ніж приблизно 5000.

У деяких варіантах здійснення другий матеріал може мати рівень окиснення (O2), який вищий, ніж рівень окиснення (O1) першого матеріалу. Вищий рівень окиснення матеріалу може сприяти можливості його диспергування, набухання і/або розчинення, додатково підвищуючи сприйнятливості матеріалу до хімічного, ферментативного або біологічного впливу. У деяких варіантах здійснення для збільшення рівня окиснення другого матеріалу в порівнянні з першим матеріалом опромінення здійснюють в окиснювальному середовищі, наприклад, в атмосфері повітря або кисню, отримуючи другий матеріал, який є більш окисненим, ніж перший матеріал. Наприклад, другий матеріал може мати більше гідроксильних груп, альдегідних груп, кетонних груп, складноефірних груп або карбоксильних груп, що може підвищити його гідрофільність.

Іонізуюче випромінювання

Кожний вид випромінювання іонізує вуглецевмісний матеріал за допомогою певної взаємодії, яку визначає енергія випромінювання. Важкі заряджені частинки іонізують речовину, головним чином, за допомогою кулонівського розсіювання; крім того, в цих взаємодіях утворюються високоенергетичні електрони, які можуть додатково іонізувати речовину. Альфа-частинки являють собою ядра атомів гелію і утворюються при альфі-розпаді ядер різних радіоактивних елементів, включаючи ізотопи вісмуту, полонію, астату, радону, францію, радію, ряду актинідів, включаючи актиній, торій, уран, нептуній, кюрій, каліфорній, америцій і плутоній.

Коли використовують частинки, вони можуть бути нейтральними (незарядженими), позитивно зарядженими або негативно зарядженими. Коли частинки є зарядженими, вони можуть нести одиничний позитивний або негативний заряд, кратні заряди, наприклад, одиничний, подвійний, потрійний або навіть четверний або вищі заряди. У тих випадках, де бажано розщеплення ланцюга, можуть виявитися бажаними позитивно заряджені частинки, частково внаслідок своєї кислотної природи. Коли використовують частинки, ці частинки можуть мати масу спокою електрона або вищу масу, яка, наприклад, в 500, 1000, 1500, 2000, 10000 або навіть 100000 разів перевищує масу спокою електрона. Наприклад, частинки можуть мати масу, що складає від приблизно 1 атомної одиниці до приблизно 150 атомних одиниць, наприклад, від приблизно 1 атомної одиниці до приблизно 50 атомних одиниць, або від приблизно 1 до приблизно 25, наприклад, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 або 15 атомних одиниць. Прискорювачі, що використовуються для прискорення частинок, можуть являти собою електростатичні прискорювачі постійного струму, електродинамічні прискорювачі постійного струму, радіочастотні лінійні, магнітно-індукційні лінійні або безперервно-хвильові пристрої. Наприклад, прискорювачі типу циклотрона постачає фірма IBA (Бельгія), включаючи систему Rhodotron®, в той час як прискорювачі постійного струму постачає фірма RDI (в даній час IBA Industrial), включаючи Dynamitron®. Іони і іонні прискорювачі обговорюються в роботах Introductory Nuclear Physics (Введення в ядерну фізику), автор Kenneth S. Krane, видавництво John Wiley & Sons, Inc., 1988 р.; Krsto Prelec, Fizika B6, 1997 р., т. 4, с. 177-206; Chu, William T., "Overview of Light-ion Beam Therapy" (Огляд по терапії пучком легких іонів), конференція ICRU-IAEA, Колумбус, штат Огайо, 18-20 березня 2006 р.; Iwata, Y. та ін., "Alternating-Phase-Focused IH-DTL for Heavy-ion Medical Accelerators" (Сфокусований прогінно-трубчастий лінійний прискорювач типу Н з фазами, що чергуються, для медичних прискорювачів важких іонів), матеріали EPAC 2006 р., Единбург (Шотландія); Learner, C. M. і інш., "Status of the Superconducting ECR Ion Source Venus" (Стан надпровідного електронного циклотронного резонансного джерела іонів Venus), матеріали EPAC 2000 р., Відень (Австрія).

Гамма-випромінювання має перевагу значної глибини проникнення в різноманітні матеріали. Джерела гамма-випромінювання включають ядра радіоактивних елементів, в тому числі ізотопи кобальту, кальцію, технецію, хрому, галію, індію, йоду, заліза, криптону, самарію, селену, натрію, талію і ксенону.

Джерела рентгенівського випромінювання включають зіткнення електронного пучка з металевими мішенями, виготовленими, в тому числі, з вольфраму або молібдену або сплавів, або компактні джерела світла, в тому числі ті, які виробляє фірма Lyncean.

Джерела ультрафіолетового випромінювання включають дейтерієві або кадмієві лампи.

Джерела інфрачервоного випромінювання включають керамічні лампи з вікном з сапфіру, цинку або селеніду.

Джерела мікрохвильового випромінювання включають клістри, радіочастотні джерела типу Слевіна (Slevin) або джерела атомних пучків, які використовують гази, в тому числі водень, кисень або азот.

У деяких варіантах здійснення пучок електронів використовують як джерело випромінювання. Пучок електронів має переваги високої потужності дози (наприклад, 1, 5 або навіть 10 Мрад на секунду), високої продуктивності, меншого об'єму і меншого вмісту обладнання. Електрони можуть також виявитися більш ефективними в реакціях розщеплення ланцюга. Крім того, електрони, що мають енергію від 4 до 10 MeV, можуть мати глибину проникнення від 5 до 30 мм або більше, в тому числі 40 мм.

Електронні пучки можна створювати, використовуючи, наприклад, електростатичні генератори, каскадні генератори, генератори-трансформатори, низькоенергетичні прискорювачі з системою сканування, низькоенергетичні прискорювачі з лінійним катодом, лінійні прискорювачі і імпульсні прискорювачі. Електрони як джерело іонізуючого випромінювання можуть бути корисні, наприклад, для відносно тонких зрізів матеріалу, наприклад, менше ніж 0,5 дюйма, наприклад, менше ніж 0,4 дюйма, 0,3 дюйма, 0,2 дюйма, або менше ніж 0,1 дюйма (12,7, 10,16, 7,62, 5,08 або 2,54 мм, відповідно). У деяких варіантах здійснення енергія кожного електрона в електронному пучку складає від приблизно 0,3 MeV до приблизно 2,0 MeV (мільйонів електрон-вольт), наприклад, від приблизно 0,5 MeV до приблизно 1,5 MeV або від приблизно 0,7 MeV до приблизно 1,25 MeV.

Пристрої для опромінення електронним пучком можуть серійно виробляти фірми Ion Beam Applications, (Луве-ла-Нев, Бельгія) або Titan Corporation (Сан-Дієго, штат Каліфорнія). Типові енергії електронів можуть становити 1 MeV, 2 MeV, 4,5 MeV, 7,5 MeV або 10 MeV. Типова потужність пристрою для опромінення електронним пучком може становити 1 кВт, 5 кВт, 10 кВт, 20 кВт, 50 кВт, 100 кВт, 250 кВт або 500 кВт. Рівень де полімеризації вихідного матеріалу

залежить від використовуваної енергії електронів і застосовуваної дози, в той час як час опромінення залежить від потужності і дози. Типові дози можуть приймати значення, що становлять 1 кГр (кілогрей), 5 кГр, 10 кГр, 20 кГр, 50 кГр, 100 кГр або 200 кГр.

Пучки іонних частинок

Можна використовувати важчі частинки, ніж електрони, щоб опромінювати будь-який з матеріалів біомаси, описаних в даному документі. Наприклад, можна використовувати протони, ядра гелію, іони аргону, іони кремнію, іони неону, іони вуглецю, іони фосфору, іони кисню або іони азоту. У деяких варіантах здійснення частинки важчі ніж електрони можуть спричиняти більш значне розщеплення ланцюга (в порівнянні з частинками меншої маси). У деяких випадках позитивно заряджені частинки можуть виробляти більш значне розщеплення ланцюга, ніж негативно заряджені частинки, внаслідок своєї кислотності.

Пучок важчих частинок можна створювати, наприклад, використовуючи лінійні прискорювачі або циклотрони. У деяких варіантах здійснення енергія кожної частинки в пучку складає від приблизно 1,0 MeV/ат. од. до приблизно 6000 MeV/ат. од., наприклад, від приблизно 3 MeV/ат. од. до приблизно 4800 MeV/ат. од. або від приблизно 10 MeV/ат. од. до приблизно 1000 MeV/ат. од. (атомна одиниця).

У певних варіантах здійснення іонні пучки, що використовуються для опромінення вуглецевмісних матеріалів, наприклад, матеріалу біомаси, можуть включати іони більше ніж одного типу. Наприклад, іонні пучки можуть включати суміші іонів двох або більше (наприклад, трьох, чотирьох або більше) різних типів. Зразкові суміші можуть включати іони вуглецю і протони, іони вуглецю і іони кисню, іони азоту і протони, і іони заліза і протони. У більш загальному випадку суміші будь-яких вказаних вище іонів (або будь-яких інших іонів) можна використовувати для створення опромінюючих іонних пучків. Зокрема, суміші відносно легких і відносно важких іонів можна використовувати в одному іонному пучку.

У деяких варіантах здійснення іонні пучки для опромінення матеріалів включають позитивно заряджені іони. Позитивно заряджені іони можуть включати, наприклад, позитивно заряджені іони водню (наприклад, протони), іони інертних газів (включаючи, наприклад, гелій, неон, аргон), іони вуглецю, іони азоту, іони кисню, іони кремнію, іони фосфору і іони металів, в тому числі іони натрію, іони кальцію і/або іони заліза. Без наміру слідувати якій-небудь теорії, вважають, що вказані позитивно заряджені іони виявляють хімічні властивості кислот Льюїса при впливі на матеріали, ініціюючи і підтримуючи реакції катіонного розщеплення ланцюга з розкриттям циклу в окиснювальному середовищі.

У певних варіантах здійснення іонні пучки для опромінення матеріалів включають негативно заряджені іони. Негативно заряджені іони можуть включати, наприклад, негативно заряджені водень іони (наприклад, гідрид-іони) і негативно заряджені іони різних відносно електронегативних ядер (наприклад, іони кисню, іони азоту, іони вуглецю, іони кремнію і іони фосфору). Без наміру слідувати якій-небудь теорії, вважають, що такі негативно заряджені іони виявляють хімічні властивості основ Льюїса при впливі на матеріали, ініціюючи і підтримуючи реакції катіонного розщеплення ланцюга з розкриттям циклу у відновному середовищі.

У деяких варіантах здійснення пучки для опромінення матеріалів можуть включати нейтральні атоми. Наприклад, пучки, що містять будь-який один або більше видів атомів з числа, до яких належать атоми водню, атоми гелію, атоми вуглецю, атоми азоту, атоми кисню, атоми неону, атоми кремнію, атоми фосфору, атоми аргону і атоми заліза, використовують для опромінення матеріалу біомаси. Як правило, в пучках можуть бути присутніми суміші атомів двох або більше типів (наприклад, трьох або більше, чотирьох або більше, або ще більше типів).

У певних варіантах здійснення іонні пучки, що використовуються для опромінення матеріалів, включають іони з одиничним зарядом, в тому числі один або більше з іонів H^+ , H^- , He^+ , He^- , Ar^+ , C^+ , C^- , O^+ , O^- , N^+ , N^- , Si^+ , Si^- , P^+ , P^- , Na^+ , Ca^+ і Fe^+ . У деяких варіантах здійснення іонні пучки можуть включати іони з кратними зарядами, в тому числі один або більше з іонів C^{2+} , C^{3+} , C^{4+} , N^{3+} , N^{5+} , N^{3-} , O^{2+} , O^{2-} , O^{22-} , Si^{2+} , Si^{4+} , Si^{2-} і Si^{4-} . Як правила, іонні пучки можуть також включати більш складні багатоядерні іони, які несуть кратні позитивні або негативні заряди. У певних варіантах здійснення, внаслідок структури багатоядерного іона, позитивні або негативні заряди можуть ефективно розподілятися по практично всій структурі іонів. У деяких варіантах здійснення позитивні або негативні заряди можуть в деякій мірі локалізуватися на частинах структури іонів.

Електромагнітне випромінювання

У варіантах здійснення, в яких опромінення здійснюють за допомогою електромагнітного випромінювання, електромагнітне випромінювання може мати, наприклад, енергію на фотон (в електрон-вольтах), що складає більше ніж 102 eV, наприклад, більше ніж 103, 104, 105, 106 або

навіть більше ніж 107 еВ. У деяких варіантах здійснення електромагнітне випромінювання має енергію на фотон, що складає від 104 до 107, наприклад, від 105 до 106 еВ. Електромагнітне випромінювання може мати частоту, що складає, наприклад, більше ніж 1016 Гц, більше ніж 1017 Гц, 1018, 1019, 1020 або навіть більше ніж 1021 Гц. У деяких варіантах здійснення електромагнітне випромінювання має частоту, що складає від 1018 до 1022 Гц, наприклад, від 1019 до 1021 Гц.

Гасіння і регульована функціоналізація біомаси

Після обробки іонізуючим випромінюванням будь-який з матеріалів або сумішей, описаних в даному документі, можуть ставати іонізованими; тобто оброблений матеріал може включати радикали, які можна виявити за допомогою спектрометра електронного парамагнітного (спінового) резонансу. Якщо іонізована біомаса залишається в атмосфері, вона буде окиснюватися, в тому числі в такій мірі, що карбоксильні групи утворюються в реакції з атмосферним киснем. У деяких випадках для деяких матеріалів таке окиснення (бажаним, тому що воно може сприяти подальшому зменшенню молекулярної маси вуглецевмісної біомаси, і окиснення груп, наприклад, карбоксильних груп, може бути корисним для розчинності і використання мікроорганізмів в деяких випадках. Однак оскільки радикали можуть "жити" протягом деякого часу після опромінення, наприклад, більше ніж 1 доба, 5 діб, 30 діб, 3 місяці, 6 місяців або навіть більше ніж 1 рік, властивості матеріалу можуть продовжувати змінюватися з плином часу, що в деяких випадках може виявитися небажаним. Таким чином, може виявитися бажаним гасіння іонізованого матеріалу.

Після іонізації будь-який матеріал біомаси, який був іонізований, можна гасити, щоб зменшити рівень радикалів в іонізованій біомасі, наприклад, таким чином, щоб радикали перестали виявлятися за допомогою спектрометра електронного парамагнітного резонансу. Наприклад, радикали можна гасити шляхом прикладання достатнього тиску до біомаси і/або шляхом використання в контакт з іонізованою біомасою текучого середовища, в тому числі газоподібного або рідкого, що вступає в реакцію (гасіння) з радикалами. Введення газу або рідини, щоб щонайменше сприяти гасінню радикалів, можна використовувати для функціоналізації іонізованої біомаси, шляхом утворення функціональних груп бажаної кількості і виду, включаючи карбоксильні групи, енольні групи, альдегідні групи, нітрогрупи, нітрильні групи, аміногрупи, алкіламіногрупи, алкільні групи, хлоралкільні групи або хлорфторалкільні групи.

У деяких випадках таке гасіння може поліпшувати стійкість деяких іонізованих матеріалів біомаси. Наприклад, гасіння може підвищувати стійкість біомаси до окиснення. Функціоналізація шляхом гасіння може також поліпшувати розчинність будь-якої біомаси, описаної в даному документі, може підвищувати термічну стійкість і може прискорювати утилізацію матеріалу різноманітними мікроорганізмами. Наприклад, функціональні групи, що утворюються в матеріалі біомаси в процесі гасіння, можуть виступати як місця специфічної адсорбції для прикріплення мікроорганізмів, наприклад, щоб прискорити гідроліз целюлози різними мікроорганізмами.

У деяких варіантах здійснення гасіння включає прикладання тиску до біомаси, в тому числі за допомогою механічної деформації біомаси, наприклад, безпосереднього механічного стиснення біомаси по одному, двох або трьох напрямках, або прикладання тиску до текучого середовища, в яке занурена біомаса, використовуючи, наприклад, ізостатичне стиснення. У таких випадках сама деформація матеріалу виробляє радикали, які часто захоплюються в доменах кристалічної структури в досить тісній близькості один від одного, в результаті чого радикали можуть рекомбінувати або реагувати з іншою групою.

У деяких випадках тиск прикладають разом з підведенням тепла, в тому числі достатньої кількості тепла для підвищення температури біомаси вище ніж температура плавлення або температуру розм'якшення компонента біомаси, в тому числі лігніну, целюлози або геміцелюлози. Нагрівання може підвищувати рухливість молекул матеріалу, що може сприяти гасінню радикалів. Коли тиск використовують для гасіння, цей тиск може складати більше ніж приблизно 1000 фунтів на кв. дюйм (7 МПа), в тому числі більше ніж приблизно 1250 фунтів на кв. дюйм (8,75 МПа), 1450 фунтів на кв. дюйм (10,15 МПа), 3625 фунтів на кв. дюйм (25,38 МПа), 5075 фунтів на кв. дюйм (35,53 МПа), 7250 фунтів на кв. дюйм (50,75 МПа), 10000 фунтів на кв. дюйм (70 МПа) або навіть більше ніж 15000 фунтів на кв. дюйм (105 МПа).

У деяких варіантах здійснення гасіння включає контакт біомаси з текучим середовищем, в тому числі рідким або газоподібним, наприклад, газом, здатним реагувати з радикалами, в тому числі ацетиленом або сумішшю ацетилену з азотом, етиленом, хлорованими етиленами або хлорфторетиленами, пропіленом або сумішшю цих газів. У інших певних варіантах здійснення гасіння включає контакт біомаси з рідиною, наприклад, рідиною, яка розчиняється, або щонайменше здатна проникати в біомасу і реагувати з радикалами, в тому числі діеном, в тому

числі 1,5-циклооктадієном. У деяких особливих варіантах здійснення гасіння включає контакт біомаси з антиоксидантом, в тому числі вітаміном Е. За необхідності вихідний матеріал біомаси може включати диспергований в ній антиоксидант, і гасіння може відбуватися при контакті з радикалами антиоксиданту, диспергованого у вихідному матеріалі біомаси.

5 Функціоналізацію можна посилювати, використовуючи важкі заряджені іони, в тому числі будь-які з важких іонів, описаних в даному документі. Наприклад, якщо бажано прискорити окиснення, для опромінення можна використовувати заряджені іони кисню. Якщо бажані азотні функціональні групи, можна використовувати іони азоту або аніони, які включають азот. Аналогічним чином, якщо бажані групи, що містять сірку або фосфор, в опроміненні можна
10 використовувати іони сірки або фосфору.

Дози

У деяких випадках опромінення здійснюють при потужності дози, що складає більше ніж приблизно 0,25 Мрад на секунду, наприклад, більше ніж приблизно 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0 або
15 навіть більше ніж приблизно 2,5 Мрад на секунду. У деяких варіантах здійснення опромінення здійснюють при потужності дози, що складає від 5,0 і 1500,0 кілорад/год., наприклад, від 10,0 до 750,0 кілорад/год. або від 50,0 до 350,0 кілорад/год.

У деяких варіантах здійснення опромінення (при використанні будь-якого джерела випромінювання або поєднання джерел) здійснюють доти, доки матеріал не отримає дозу, що становить щонайменше 0,1 Мрад, щонайменше 0,25 Мрад, наприклад, щонайменше 1,0 Мрад,
20 щонайменше 2,5 Мрад, щонайменше 5,0 Мрад, щонайменше 10,0 Мрад, щонайменше 60 Мрад або щонайменше 100 Мрад. У деяких варіантах здійснення опромінення здійснюють доти, доки матеріал не отримає дозу, що складає від приблизно 0,1 Мрад до приблизно 500 Мрад, від приблизно 0,5 Мрад до приблизно 200 Мрад, від приблизно 1 Мрад до приблизно 100 Мрад або від приблизно 5 Мрад до приблизно 60 Мрад. У деяких варіантах здійснення застосовують
25 відносно низьку дозу опромінення, що складає, наприклад, менше ніж 60 Мрад.

Ультразвукова обробка

Ультразвукова обробка може зменшувати молекулярну масу і/або кристалічність матеріалів, в тому числі одного або більше з будь-яких матеріалів, описаних в даному документі, включаючи, наприклад, один або більше за вуглеводних джерел, в тому числі целюлозні або
30 лігноцелюлозні матеріали, або крохмальні матеріали. Ультразвукову обробку можна також використовувати для стерилізації матеріалів.

У одному способі, перший матеріал, який включає целюлозу, що має першу середньочисельну молекулярну масу (MN1), диспергований в середовищі, в тому числі воді, і оброблений ультразвуком і/або іншим способом підданий кавітації, щоб отримати другий
35 матеріал, який включає целюлозу, що має другу середньочисельну молекулярну масу (MN2), яка нижча, ніж перша середньочисельна молекулярна маса. Другий матеріал (або перший і другий матеріал в певних варіантах здійснення) можна поєднувати з мікроорганізмом (із застосуванням або без застосування ферментативної обробки), який може використовувати другий і/або перший матеріал, щоб виробляти проміжний або кінцевий продукт.

40 Оскільки другий матеріал включає целюлозу, що має зменшену молекулярну масу в порівнянні з першим матеріалом, а в деяких випадках також і зменшену кристалічність, другий матеріал, як правило, краще диспергується, набухає і/або розчиняється, наприклад, в розчині, що містить мікроорганізм.

У деяких варіантах здійснення друга середньочисельна молекулярна маса (MN2) складає
45 менше, ніж перша середньочисельна молекулярна маса (MN1) більше ніж на приблизно 10 %, наприклад, більше ніж на приблизно 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 %, 60 %, або навіть більше ніж на приблизно 75 %.

У деяких випадках другий матеріал включає целюлозу, яка має кристалічність (C2), що складає менше, ніж кристалічність (C1) целюлози першого матеріалу. Наприклад, величина C2
50 може бути меншою, ніж величина C1 більше ніж на приблизно 10 %, наприклад, більше ніж на приблизно 15, 20, 25, 30, 35, 40 або навіть більше ніж на приблизно 50 %.

У деяких варіантах здійснення вихідний індекс кристалічності (до ультразвукової обробки) складає від приблизно 40 до приблизно 87,5 %, наприклад, від приблизно 50 до приблизно 75 %
55 або від приблизно 60 до приблизно 70 %, і індекс кристалічності після ультразвукової обробки складає від приблизно 10 до приблизно 50 %, наприклад, від приблизно 15 до приблизно 45 % або від приблизно 20 до приблизно 40 %. Однак в певних варіантах здійснення наприклад, після значної ультразвукової обробки, можна отримати індекс кристалічності, що складає менше ніж 5 %. У деяких варіантах здійснення матеріал після ультразвукової обробки є практично аморфним.

У деяких варіантах здійснення вихідна середньочисельна молекулярна маса (до ультразвукової обробки) складає від приблизно 200000 до приблизно 3200000, наприклад, від приблизно 250000 до приблизно 1000000 або від приблизно 250000 до приблизно 700000, і середньочисельна молекулярна маса після ультразвукової обробки складає від приблизно 50000 до приблизно 200000, наприклад, від приблизно 60000 до приблизно 150000 або від приблизно 70000 до приблизно 125000. Однак в деяких варіантах здійснення, наприклад, після значної ультразвукової обробки, можна отримати середньочисельну молекулярну масу, що складає менше ніж приблизно 10000 або навіть менше ніж приблизно 5000.

У деяких варіантах здійснення другий матеріал може мати рівень окиснення (O2), який вищий, ніж рівень окиснення (O1) першого матеріалу. Вищий рівень окиснення матеріалу може сприяти можливості його диспергування, набухання і/або розчинення, додатково підвищуючи сприйнятливості матеріалу до хімічного, ферментативного або мікробного впливу. У деяких варіантах здійснення, щоб підвищити рівень окиснення другого матеріалу в порівнянні з першим матеріалом, ультразвукову обробку здійснюють в окиснювальному середовищі, отримуючи другий матеріал, який є в більшій мірі окисненим, ніж перший матеріал. Наприклад, другий матеріал може містити більше гідроксильних груп, альдегідних груп, кетонних груп, складноефірних груп або карбоксильних груп, що може збільшити його гідрофільність.

У деяких варіантах здійснення середовище ультразвукової обробки являє собою водне середовище. При необхідності середовище може включати окисник, в тому числі пероксид (наприклад, пероксид водню), диспергатор і/або буфер. Приклади диспергаторів включають іонні диспергатори, наприклад, лаурилсульфат натрію, і неіонні диспергатори, наприклад, поліетиленгліколь.

У інших варіантах здійснення середовище ультразвукової обробки є неводним. Наприклад, ультразвукову обробку можна здійснювати у вуглеці, включаючи, наприклад, толуол або гептан, простому ефірі, включаючи, наприклад, діетиловий ефір або тетрагідрофуран, або навіть в зрідженому газі, включаючи, наприклад, аргон, ксенон або азот.

Піроліз

Можна використовувати один або більше способів піролітичної обробки, щоб фізично обробляти матеріал біомаси. Піроліз можна також використовувати для стерилізації матеріалу.

У одному прикладі перший матеріал, який включає целюлозу, що має першу середньочисельну молекулярну масу (MN1), піддають піролізу, наприклад, шляхом нагрівання першого матеріалу в трубчастій печі (в присутності або за відсутності кисню), щоб отримати другий матеріал, який включає целюлозу, що має другу середньочисельну молекулярну масу (MN2), яка нижча, ніж перша середньочисельна молекулярна маса.

Оскільки другий матеріал включає целюлозу, що має зменшену молекулярну масу в порівнянні з першим матеріалом, а в деяких випадках також і зменшену кристалічність, другий матеріал, як правило, краще диспергується, набухає і/або розчиняється, наприклад, в розчині, що містить мікроорганізм.

У деяких варіантах здійснення друга середньочисельна молекулярна маса (MN2) є нижчою, ніж перша середньочисельна молекулярна маса (MN1) більше ніж на приблизно 10 %, наприклад, більше ніж на приблизно 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 %, 60 % або навіть більше ніж на приблизно 75 %.

У деяких випадках другий матеріал включає целюлозу, яка має кристалічність (C2), меншу ніж кристалічність (C1) целюлози першого матеріалу. Наприклад, значення (C2) може бути нижчим, ніж значення (C1) більше ніж на приблизно 10 %, наприклад, більше ніж на приблизно 15, 20, 25, 30, 35, 40 або навіть більше ніж на приблизно 50 %.

У деяких варіантах здійснення вихідний індекс кристалічності (до піролізу) складає від приблизно 40 до приблизно 87,5 %, наприклад, від приблизно 50 до приблизно 75 % або від приблизно 60 до приблизно 70 %, і індекс кристалічності після піролізу складає від приблизно 10 до приблизно 50 %, наприклад, від приблизно 15 до приблизно 45 % або від приблизно 20 до приблизно 40 %.

Однак в певних варіантах здійснення, наприклад, після значного піролізу, можна отримати індекс кристалічності, що складає менше ніж 5 %. У деяких варіантах здійснення матеріал після піролізу є практично аморфним.

У деяких варіантах здійснення вихідна середньочисельна молекулярна маса (до піролізу) складає від приблизно 200000 до приблизно 3200000, наприклад, від приблизно 250000 до приблизно 1000000 або від приблизно 250000 до приблизно 700000, і середньочисельна молекулярна маса після піролізу складає від приблизно 50000 до приблизно 200000, наприклад, від приблизно 60000 до приблизно 150000 або від приблизно 70000 до приблизно 125000. Однак в деяких варіантах здійснення, наприклад, після значного піролізу, можна отримати

середньочисельну молекулярну масу, що складає менше ніж приблизно 10000 або навіть менше ніж приблизно 5000.

У деяких варіантах здійснення другий матеріал може мети рівень окиснення (O2), який є вищим, ніж рівень окиснення (O1) першого матеріалу. Вищий рівень окиснення матеріалу може сприяти можливості його диспергування, набухання і/або розчинення, додатково підвищуючи сприйнятливості матеріалу до хімічного, ферментативного або мікробного впливу. У деяких варіантах здійснення, щоб підвищити рівень окиснення другого матеріалу в порівнянні з першим матеріалом, піроліз здійснюють в окиснювальному середовищі, отримуючи другий матеріал, який є окисненим в більшій мірі, ніж перший матеріал. Наприклад, другий матеріал може містити більше гідроксильних груп, альдегідних груп, кетонних груп, складноефірних груп або карбоксильних груп, ніж перший матеріал, в результаті чого збільшується гідрофільність матеріалу.

У деяких варіантах здійснення піроліз матеріалів є безперервним. У інших варіантах здійснення матеріал піддають піролізу протягом заданого періоду часу і потім залишають охолоджуватися протягом другого заданого періоду часу, перш ніж знову піддати його піролізу.

Окиснення

Один або більше способів окиснювальної обробки можна використовувати для фізичної обробки матеріалу біомаси. Умови окиснення можна змінювати, наприклад, залежно від вмісту лігніну у вихідному матеріалі, причому вищий ступінь окиснення, як правило, є бажаним для вищого вмісту лігніну з вихідних матеріалів.

У одному способі перший матеріал, який включає целюлозу, що має першу середньочисельну молекулярну масу (MN1) і має перший вміст кисню (O1), окиснюють, наприклад, нагріванням першого матеріалу в потоці повітря або збагаченого киснем повітря, щоб отримати другий матеріал, який включає целюлозу, що має другу середньочисельну молекулярну масу (MN2), і має другий вміст кисню (O2), що перевищує перший вміст кисню (O1).

Друга середньочисельна молекулярна маса другого матеріалу, як правило, складає менше, ніж перша середньочисельна молекулярна маса першого матеріалу. Наприклад, молекулярну масу можна зменшувати в такій же мірі, як обговорювалося вище відносно інших видів фізичної обробки. Кристалічність другого матеріалу можна також зменшувати в такій же мірі, як обговорювалося вище відносно інших видів фізичної обробки.

У деяких варіантах здійснення другий вміст кисню складає щонайменше на приблизно п'ять процентів вище, ніж перший вміст кисню, наприклад, на 7,5 % вище, на 10,0 % вище, на 12,5 % вище, на 15,0 % вище або на 17,5 % вище. У деяких переважних варіантах здійснення другий вміст кисню складає щонайменше на приблизно 20,0 % вище, ніж перший вміст кисню першого матеріалу. Вміст кисню вимірюють елементним аналізом шляхом піролізу зразка в печі, яка працює при 1300 °C або вищої температури. Прийнятним пристроєм для елементного аналізу є аналізатор LECO CHNS-932 з пічкою VTF-900 для високотемпературного піролізу.

Як правило, окиснення матеріалу відбувається в окиснювальному середовищі. Наприклад, окиснення можна здійснювати або йому можна сприяти шляхом піролізу в окиснювальному середовищі, в тому числі в атмосфері повітря або збагаченого повітрям аргону. Щоб сприяти окисненню, можна додавати різні хімічні реагенти, в тому числі окисники, кислоти або основи до матеріалу до, або під час окиснення. Наприклад, пероксид (наприклад, бензоїлпероксид) можна додавати до окиснення.

У деяких окиснювальних способах зменшення стійкості вихідного матеріалу біомаси використовують хімічні реакції типу реакції Фентона (Fenton). Такі способи описані, наприклад, в патентній заявці США № 12/6392:39, повний опис якої включений в даний документ за допомогою посилання.

Зразкові окисники включають пероксида, в тому числі пероксид водню і бензоїлпероксид, персульфати, в тому числі персульфат амонію, активовані форми кисню, в тому числі озон, перманганати, в тому числі перманганат калію, перхлорати, в тому числі перхлорат натрію, і гіпохлорити, в тому числі гіпохлорит натрію (відбілювач для домашнього господарства).

У деяких ситуаціях в процесі контакту величину pH підтримують на рівні або нижче ніж приблизно 5,5, в тому числі в інтервалі від 1 до 5, від 2 до 5, від 2,5 до 5 або від приблизно 3 до 5.

Умови окиснення можуть також включати період контакту, що складає від 2 до 12 годин, наприклад, від 4 до 10 годин або від 5 до 8 годин. У деяких випадках температуру підтримують на рівні або нижче ніж 300 °C, наприклад, на рівні або нижче ніж 250, 200, 150, 100 або 50 °C. У деяких випадках температура залишається практично такою, що дорівнює температурі навколишнього середовища, наприклад, на рівні або приблизно 20-25 °C.

У деяких варіантах здійснення один або більше окисників використовують у вигляді газу, в тому числі шляхом утворення озону на місці використання при опроміненні матеріалу через повітря пучком частинок, в тому числі електронів.

У деяких варіантах здійснення суміш додатково включає один або більше гідрохінонів, в тому числі 2,5-диметоксигідрохінон (DMHQ) і/або один або більше бензохінонів, в тому числі 2,5-диметокси-1,4-бензохінон (DMBQ), які можуть сприяти в реакції перенесення електронів.

У деяких варіантах здійснення один або більше окисників електрохімічно отримують на місці застосування. Наприклад, пероксид водню і/або озон можна електрохімічно виготовляти в контакті або в реакційній посудині.

Інші способи функціоналізації

Будь-який із способів даного параграфу можна використовувати індивідуально без яких-небудь способів, описаних в даному документі, або в поєднанні з будь-яким зі способів, описаних в даному документі (в будь-якому порядку): паровий вибух, хімічна обробка (наприклад, кислотна обробка (включаючи кислотну обробку концентрованими і розбавленими мінеральними кислотами, в тому числі сірчаною кислотою, соляною кислотою, і органічними кислотами, в тому числі трифтороцтовою кислотою) і/або лужна обробка (наприклад, обробка вапном або гідроксидом натрію)), ультрафіолетове опромінення, обробка методом черв'ячної екструзії (див., наприклад, патентну заявку США № 61/115398, подану 17 листопада, 2008 р.), обробка розчинниками (наприклад, обробка іонними рідинами) і кріопомел (див., наприклад, патентну заявку США № 12/502629).

Ферментація

Мікроорганізми можуть виробляти ряд корисних проміжних і кінцевих продуктів, в тому числі ті, які описані в даному документі, шляхом ферментації низькомолекулярного цукру в присутності функціоналізованого матеріалу біомаси. Наприклад, в ході ферментації або інших біопроцесів можна отримувати спирти, органічні кислоти, вуглеводні, водень, білки або суміші будь-яких даних матеріалів.

Мікроорганізм може являти собою природний мікроорганізм або генетично модифікований мікроорганізм. Наприклад, мікроорганізм може являти собою бактерію, наприклад, целюлітичну бактерію, грибок, наприклад, дріжджі, рослину або протист, наприклад, водорість, найпростіше або грибоподібний протист, наприклад, слизовик (міксоміцет). Коли організми є сумісними, можна використовувати суміші організмів.

Прийнятні для ферментації мікроорганізми мають здатність конвертувати вуглеводи, в тому числі глюкозу, ксиліозу, арабінозу, манозу, галактозу, олігосахариди або полісахариди, в продукти ферментації. Ферментуючі мікроорганізми включають штами роду *Saccharomyces* (цукрові грибки), наприклад, види *Saccharomyces cerevisiae* (пекарські дріжджі), *Saccharomyces distaticus*, *Saccharomyces uvarum*; під *Kluveromyces*, наприклад, види *Kluveromyces marxianus*, *Kluveromyces fragilis*; під *Candida* (кандида), наприклад, *Candida pseudotropicalis*, і *Candida brassicae*, *Pichia stipitis* (родич *Candida shehatae*), під *Clavispora*, наприклад, види *Clavispora lusitaniae* і *Clavispora opuntiae*, під *Pachysolen*, наприклад, види *Pachysolen tannophilus*, під *Bretannomyces*, наприклад, види *Bretannomyces clausenii* (Philippidis G. P., розділ *Cellulose Bioconversion Technology* (Технологія біоконверсії целюлози) в книзі *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization* (Довідник по біоетанолу: виробництво і застосування), під ред. Wyman C. E., видавництво Taylor & Francis, Вашингтон, округ Колумбія, 1996 р., с. 179-212).

Дріжджі, що є в продажу, включають, наприклад, Red Star®/Lesaffre Ethanol Red, постачальник Red Star/Lesaffre (США); FALI®, постачальник Fleischmann's Yeast, відділення фірми Burns Philip Food Inc. (США); SUPERSTART®, постачальник Alltech, в даний час Lalemand; GERT®, постачальник Gert Strand AB (Швеція); і FERMOL®, постачальник DSM Specialties.

У ферментації можна також використовувати бактерії, наприклад, *Zyomonas mobilis* і *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996 р., див. вище).

Оптимальне значення рН для дріжджів складає приблизно від 4 до 5, в той час як оптимальне значення рН для бактерій *Zyomonas* складає приблизно від 5 до 6. Типові терміни ферментації складають приблизно від 24 до 96 годин при температурі в інтервалі від 26 °C до 40 °C, однак термофільні мікроорганізми віддають перевагу вищим температурам.

У деяких варіантах здійснення процес ферментації можна переривати повністю або частково, перш ніж низькомолекулярний цукор буде повністю конвертований в етанол. Проміжні продукти ферментації включають висококонцентровані цукор і вуглеводи. Ці проміжні продукти ферментації можна використовувати в приготуванні їжі для людини або тварин. Додатково або, як альтернатива, проміжні продукти ферментації можна молоти, стримуючи дрібнодисперсні

частинки, використовуючи лабораторний млин з неіржавіючої сталі і отримуючи схожий на борошно матеріал.

Можна використовувати мобільні ферментери, які описані у тимчасовій патентній заявці США № 60/832735 і в опублікованій в даний час міжнародній патентній заявці № WO 2008/011598.

Подальша обробка

Дистиляція

Після ферментації, отримані текучі середовища можна дистилювати, використовуючи, наприклад, "бражну колону", щоб відділити етанол і інші спирти від складаючої основну масу води і залишкової твердої фази. Пара, що виходить з колони, може містити, наприклад, 35 мас. % етанолу і може надходити в ректифікаційну колону. Майже азеотропну суміш (92,5 %) етанолу і води з ректифікаційної колони можна очищати і отримувати чистий (99,5 %) етанол, використовуючи парові фазні молекулярні сита. Донні осади з бражної колони можна спрямовувати на першу стадію тристадійного випарника. Дефлегматор ректифікаційної колони може забезпечувати тепло для цієї першої стадії. Після першої стадії тверду фазу можна відділяти з допомогою центрифуги і сушити в роторній сушарці. Частину текучого середовища (25 %), що виходить з центрифуги, можна повертати на ферментацію, а залишок спрямовувати на другу і третю стадію випарника. Велику частину конденсату з випарника можна повертати в процес у вигляді досить чистого конденсату, а невелику частину відділяти для обробки стічної води, щоб запобігти утворенню низькокиплячих сполук.

Проміжні і кінцеві продукти

Способи, описані в даному документі, можна використовувати для виробництва одного або більше проміжних або кінцевих продуктів, включаючи енергію, паливо, харчові продукти і матеріали. Конкретні приклади продуктів включають, але не обмежуються цим, водень, спирти (наприклад, одноатомні спирти або двоатомні спирти, в тому числі етанол, н-пропанол або н-бутанол), гідратовані або водні спирти, наприклад, що містять більше ніж 10 %, 20 %, 30 % або навіть більше ніж 40 % води, ксиліт, цукри, біодизельне паливо, органічні кислоти (наприклад, оцтова кислота і/або молочна кислота), вуглеводні, супутні продукти (наприклад, білки, в тому числі целюлітичні білки (ферменти) або генетично однорідні білки) і суміші будь-яких даних продуктів в будь-яких поєднаннях або відносних концентраціях, і необов'язково в поєднанні з будь-якими добавками, включаючи, наприклад, паливні добавки. Інші приклади включають карбонові кислоти, в тому числі оцтову кислоту або масляну кислоту, солі карбонових кислот, суміші карбонових кислот і солей карбонових кислот, складні ефіри карбонових кислот (наприклад, метилові, етилові і н-пропілові складні ефіри), кетон (наприклад, ацетон), альдегіди (наприклад, ацетальдегід), α,β -ненасичені кислоти, в тому числі акрилову кислоту, і олефіни, в тому числі етилен. Інші спирти і похідні спиртів включають пропанол, пропіленгліколь, 1,4-бутандіол, 1,3-пропандіол, метиловий або етиловий простий ефір даних спиртів. Інші продукти включають метилакрилат, метилметакрилат, молочну кислоту, пропіонову кислоту, масляну кислоту, бурштинову кислоту, 3-гідроксипропіонову кислоту, солі будь-яких даних кислот і суміші будь-яких кислот і відповідних солей.

Інші проміжні і кінцеві продуктів, включаючи продукти харчування і фармацевтичні вироби, описані в патентній заявці США № 12/417900, повний опис якої включений за допомогою посилання в даний документ.

Приклади

Наступні приклади призначені для ілюстрації, а не обмеження об'єму даного опису.

Приклад 1. Отримання волокнистого матеріалу з паперу з багатошаровим покриттям

Партію, що містить 1500 фунтів (681 кг) невживаних півгалонів (1,89 л) упаковок для соку, виготовлених з білого крафт-картону з багатошаровим покриттям без друку, що має об'ємну густину 20 фунтів на куб. фут (320 кг/м³), отримували від фірми International Paper. Кожну упаковку складали в плоский стан і потім спрямовували в подрібнювач Flinch Vaughn потужністю 3 л.с. (2,24 кВт) зі швидкістю, яка становить приблизно від 15 до 20 фунтів на годину (1,89-2,52 г/с). Подрібнювач був обладнаний двома 12-дюймовими (30,48 см) обертовими лезами, двома нерухомими лезами і 0,30-дюймовим (7,62 мм) ситом на виході. Відстань між обертовими і нерухомими лезами встановлювали на рівні 0,10 дюйма (2,54 мм). Продукт, що виходить із подрібнювача, нагадував конфетті і мав ширину від 0,1 дюйма до 0,5 дюйма (2,54-12,7 мм), довжину від 0,25 дюйма до 1 дюйма (6,35-25,4 мм) і товщину, що дорівнює товщині вихідного матеріалу (приблизно 0,075 дюйма або 1,9 мм).

Матеріал, що нагадує конфетті, надходив в різак Munson моделі SC30 з дисковими лезами. Модель SC30 містить чотири обертові леза, чотири нерухомі леза і сито на виході, що має 1/8-дюймові (3,18 мм) отвори. Відстань між обертовими і нерухомими лезами встановлювали

приблизно на рівні 0,020 дюйма (0,5 мм). Різак з дисковими лезами розрізав частинки, які нагадують конфетті, в поперечному лезам напрямку, розділяючи частинки і утворюючи волокнистий матеріал зі швидкістю, що складала приблизно один фунт на годину (0,126 г/с). Волокнистий матеріал мав питому поверхню по методу BET 0,9748 м²/г +/-0,0167 м²/г, пористість 89,0437 % і об'ємну густину (при абсолютному тиску 0,53 фунта на кв. дюйм або 3,71 кПа) 0,1260 г/мл. Середня довжина волокон становила 1,141 мм, і середня ширина волокон становила 0,027 мм, даючи середнє співвідношення L/D=42:1.

Приклад 2. Отримання волокнистого матеріалу з білого крафт картону

Партію, що містить 1500 фунтів (681 кг) неживаного білого білого крафт-картону, що має об'ємну густину 30 фунтів на куб. фут (480 кг/м³), отримували від фірми International Paper. Матеріал складали в плоский стан і потім спрямовували в подрібнювач Flinch Vaughn потужністю 3 л.с. (2,24 кВт) зі швидкістю, яка становить приблизно від 15 до 20 фунтів на годину (1,89-2,52 г/с). Подрібнювач був обладнаний двома 12-дюймовими (30,48 см) обертовими лезами, двома нерухомими лезами і 0,30-дюймовим (7,62 мм) ситом на виході. Відстань між обертовими і нерухомими лезами встановлювали на рівні 0,10 дюйма (2,54 мм). Продукт, що виходить із подрібнювача, нагадував конфетті і мав ширину від 0,1 дюйма до 0,5 дюйма (2,54-12,7 мм), довжину від 0,25 дюйма до 1 дюйма (6,35-25,4 мм) і товщину, що дорівнює товщині вихідного матеріалу (приблизно 0,075 дюйма або 1,9 мм). Матеріал, що нагадує конфетті, надходив у різак Munson моделі SC30 з дисковими лезами. Сито на виході мало 1/8-дюймові (3,18 мм) отвори. Відстань між обертовими і нерухомими лезами встановлювали приблизно на рівні 0,020 дюйма (0,5 мм). Різак з дисковими лезами розрізав частинки, що нагадують конфетті, в поперечному лезам напрямку, розділяючи частинки і утворюючи волокнистий матеріал зі швидкістю, що складала приблизно один фунт на годину (0,126 г/с). Волокнистий матеріал івав питому поверхню по методу BET 1,1316 м²/г +/-0,0103 м²/г, пористість 88,3285 % і об'ємну густину (при абсолютному тиску 0,53 фунта на кв. дюйм або 3,71 кПа) 0,1497 г/мл. Середня довжина волокон становила 1,063 мм, і середня ширина волокон становила 0,0245 мм, даючи середнє співвідношення L/D=43:1.

Приклад 3. Отримання двічі розрізаного волокнистого матеріалу з білого крафт-картону

Партію, що містить 1500 фунтів (681 кг) неживаного білого білого крафт-картону, що має об'ємну густину 30 фунтів на куб. фут (480 кг/м³), отримували від фірми International Paper. Матеріал складали в плоский стан і потім спрямовували в подрібнювач Flinch Vaughn потужністю 3 л.с. (2,24 кВт) зі швидкістю, яка становить приблизно від 15 до 20 фунтів на годину (1,89-2,52 г/с). Подрібнювач був обладнаний двома 12-дюймовими (30,48 см) обертовими лезами, двома нерухомими лезами і 0,30-дюймовим (7,62 мм) ситом на виході. Відстань між обертовими і нерухомими лезами встановлювали на рівні 0,10 дюйма (2,54 мм). Продукт, що виходить із подрібнювача, нагадував конфетті (див. вище). Матеріал, що нагадує конфетті, надходив в різак Munson моделі SC30 з дисковими лезами. Сито на виході мало 1/16-дюймові (1,59 мм) отвори. Відстань між обертовими і нерухомими лезами встановлювали приблизно на рівні 0,020 дюйма (0,5 мм). Різак з дисковими лезами розрізав частинки, що нагадують конфетті, утворюючи волокнистий матеріал зі швидкістю, що складала приблизно один фунт на годину (0,126 г/с). Отриманий після першого різання матеріал надходив назад і піддавався повторному різанню і. описаних вище умовах. Волокнистий матеріал мав питому поверхню по методу BET 1,4408 м²/г +/-0,0156 м²/г, пористість 90,8998 % і об'ємну густину (при абсолютному тиску 0,53 фунта на кв. дюйм або 3,71 кПа) 0,1299 г/мл. Середня довжина волокон становила 0,891 мм, і середня ширина волокон становила 0,026 мм, даючи середнє співвідношення L/D=34:1.

Приклад 4. Отримання тричі розрізаного волокнистого матеріалу з білого крафт-картону

Партію, що містить 1500 фунтів (681 кг) неживаного білого білого крафт-картону, що має об'ємну густину 30 фунтів на куб. фут (480 кг/м³), отримували від фірми International Paper. Матеріал складали в плоский стан і потім спрямовували в подрібнювач Flinch Vaughn потужністю 3 л.с. (2,24 кВт) зі швидкістю, яка становить приблизно від 15 до 20 фунтів на годину (1,89-2,52 г/с). Подрібнювач був обладнаний двома 12-дюймовими (30,48 см) обертовими лезами, двома нерухомими лезами і 0,30-дюймовим (7,62 мм) ситом на виході. Відстань між обертовими і нерухомими лезами встановлювали на рівні 0,10 дюйма (2,54 мм). Продукт, що виходить із подрібнювача, нагадував конфетті (див. вище). Матеріал, що нагадує конфетті, надходив в різак Munson моделі SC30 з дисковими лезами. Сито на виході мало 1/8-дюймові (3,18 мм) отвори. Відстань між обертовими і нерухомими лезами встановлювали приблизно на рівні 0,020 дюйма (0,5 мм). Різак з дисковими лезами розрізав частинки, що нагадують конфетті, в поперечному лезам напрямку. Отриманий після першого різання матеріал надходив назад в різак з такими ж умовами, але сито замінювали ситом з 1/16-дюймовими (1,59 мм) отворами. Матеріал різали. Отриманий після другого різання матеріал надходив назад в різак з такими ж умовами, але сито

замінювали ситом з 1/32-дюймовими (0,79 мм) отворами. Матеріал різали. Отриманий волокнистий матеріал мав питому поверхню по методу BET 1,6897 м²/г +/-0,0155 м²/г, пористість 87,7163 % і об'ємну густину (при абсолютному тиску 0,53 фунта на кв. дюйм або 3,71 кПа) 0,1448 г/мл. Середня довжина волокон становила 0,824 мм, і середня ширина волокон становила 0,0262 мм, даючи середнє співвідношення L/D=32:1.

Приклад 5. Обробка електронним пучком

Зразки обробляли електронним пучком, використовуючи склепінчастий безперервний хвильовий прискорювач Rhodotron® TT200, що додає електронам енергії 5 MeV при вихідній потужності 80 кВт. Таблиця 1 описує використовувані параметри. Таблиця 2 містить номінальні дози, використані для зразків з даними номерами (в Мрад) і відповідні дози, отриманих зразків (в кГр).

Таблиця 1

Параметри прискорювача Rhodotron® TT 200

Пучок	
Склад виробленого пучка	Прискорені електрони
Енергія пучка	Номінальна (фіксована): 10 MeV (+0 кеВ-250 кеВ)
Розкидання енергії при 10 MeV	Повна ширина на рівні напівмаксимуму (FWHM) 300 кеВ
Енергія пучка при 10 MeV	Гарантований робочий інтервал від 1 до 80 кВт
Енергоспоживання	
Стан без навантаження (вакуум і охолодження включені)	<15кВт
При енергії пучка 50 кВт	<210 кВт
При енергії пучка 80 кВт	<260 кВт
Радіочастотна система	
Частота	107,5±1 МГц
Тип тетрода	Thomson TH781
Скануючий рупор	
Номінальна довжина сканування (виміряна на відстані 25-35 см від вікна)	120 см
Інтервал сканування	Від 30 до 100 % номінальної довжини сканування
Номінальна частота сканування (при максимальній довжині сканування)	100 Гц±5 %
Однорідність сканування (по 90 % номінальної довжини сканування)	±5 %

Таблиця 2

Дози, передані зразкам

Повна доза (Мрад) (число відповідає номеру зразка)	Передана доза (кГр) ¹
1	9,9
3	29,0
5	50,4
7	69,2
10	100,0
15	150,3
20	198,3
30	330,9
50	529,0
70	695,9
100	993,6

¹Наприклад, доза 9,9 кГр була передана за 11 секунд при струмі пучка 5 мА і лінійній швидкості 12,9 фут/хв. (6,55 см/с). Час охолодження між операціями обробки складав приблизно 2 хвилини.

Приклад 6. Способи визначення молекулярної маси целюлозних і лігноцелюлозних матеріалів гелпронікою хроматографією

Целюлозні і лігноцелюлозні матеріали для аналізу обробляли згідно з прикладом 4. Зразки матеріалів, представлених в наступних таблицях, включають крафт-папір (P), пшеничну солому (WS), люцерну (A), целюлозу (C), просо лозиноподібне (SG), траву (G), крохмаль (ST) і сахарозу (S). Число 132 в номері зразка означає розмір частинок матеріалу після різання і пропускання через сито з отворами розміром 1/32 дюйма (0,79 мм). Число після дефіса означає дозу випромінювання (Мрад) і US означає ультразвукову обробку. Наприклад, зразок під номером P132-10 означає крафт-папір, який нарізали до розміру частинок 132 меш і опромінювали дозою 10 Мрад.

Для зразків, які опромінювали пучки електронів, число після дефіса означає кількість енергії, переданої зразку. Наприклад, зразок під номером P-100e означає крафт-папір, яким передана доза енергії, що становить приблизно 100 Мрад або приблизно 1000 кГр (таблиця 2).

Таблиця 3

Середня пікова молекулярна маса опроміненого крафт-паперу

Джерело зразка	Номер зразка	Доза (Мрад) ¹	Ультразвукова обробка ²	Середня молекулярна маса±стандартне відхилення
Крафт-папір	P132	0	Ні	32853±10006
	P132-10	10	“	61398±2468**
	P132-100	100	“	8444±580
	P132-181	181	“	6668±77
	P132-US	0	Так	3095±1013

**Імовірно, низькі дози випромінювання збільшують молекулярну масу деяких матеріалів.

¹Потужність дози=1 Мрад/год.

²Обробка протягом 30 хвилин ультразвуком (20 кГц) за допомогою рупора потужністю 1000 Вт в умовах рециркуляції матеріалу, диспергованого у воді.

Таблиця 4

Середня пікова молекулярна маса крафт-паперу, опроміненого електронним пучком

Джерело зразка	Номер зразка	Доза (Мрад) ¹	Середня молекулярна маса ± стандартне відхилення
Крафт-папір	P-1e	1	63489 ± 595
	P-5e	5	56587 ± 536
	P-10e	10	53610 ± 327
	P-30e	30	38231 ± 124
	P-70e	70	12011 ± 158
	P-100e	100	9770 ± 2

Таблиця 5

Середня пікова молекулярна маса матеріалу після гамма-опромінення

Номер зразка	Номер піка	Доза (Мрад) ¹	Ультразвукова обробка ²	Середня молекулярна маса ± стандартне відхилення
WS132	1	0	Ні	1407411 ± 175191
	2	"	"	39145 ± 3425
	3	"	"	2886 ± 177
WS132-10*	1	10	"	26040 ± 3240
WS132-100*	1	100	"	23620 ± 453
A132	1	0	"	1604886 ± 151701
	2	"	"	37525 ± 3751
	3	"	"	2853 ± 490
A132-10*	1	10	"	50853 ± 1665
	2	"	"	2461 ± 17
A132-100*	1	100	"	38291 ± 2235
	2	"	"	2487 ± 15
SG132	1	0	"	1557360 ± 83693
	2	"	"	42594 ± 4414
	3	"	"	3268 ± 249
SG132-10*	1	10	"	60888 ± 9131
SG132-100*	1	100	"	22345 ± 3797
SG132-10-US	1	10	Да	86086 ± 43518
	2	"	"	2247 ± 468
SG132-100-US	1	100	"	4696 ± 1465

* Злиття піків після обробки.

* Імовірно, низькі дози випромінювання збільшують молекулярну масу деяких матеріалів.

¹ Потужність дози = 1 Мрад/год.² Обробка протягом 30 хвилин ультразвуком (20 Гц) за допомогою рупора потужністю 1000 Вт в умовах рециркуляції матеріалу, диспергованого у воді.

Таблиця 6

Середня пікова молекулярна маса матеріалу, опроміненого електронним пучком

Номер зразка	Номер піка	Доза	Середня молекулярна маса \pm стандартне відхилення
A-1e	1	1	1004783 \pm 97518
	2		34499 \pm 482
	3		2235 \pm 1
A-5e	1	5	38245 \pm 346
	2		2286 \pm 35
A-10e	1	10	44326 \pm 33
	2		2333 \pm 18
A-30e	1	30	47366 \pm 583
	2		2377 \pm 7
A-50e	1	50	32761 \pm 168
	2		2435 \pm 6
G-1e	1	1	447362 \pm 38817
G-5e	2	5	32165 \pm 779
	3		3004 \pm 25
	1		62167 \pm 6418
G-10e	2	10	2444 \pm 33
	1		72636 \pm 4075
G-30e	2	30	3065 \pm 34
	1		17159 \pm 390
G-50e	1	50	18960 \pm 142
ST	1	0	923336 \pm 1883
	2		150265 \pm 4033
ST-1e	1	1	846081 \pm 5180
	2		131222 \pm 1687
ST-5e	1	5	90664 \pm 1370
ST-10e	1	10	98050 \pm 255
ST-30e	1	30	41884 \pm 223
ST-70e	1	70	9699 \pm 31
ST-100e	1	100	8705 \pm 38

Гельпронику хроматографію (GPC) використовують, щоб визначити молекулярно-масовий розподіл полімерів. У процесі аналізу методом GPC розчин зразка полімеру пропускають через колонку, наповнену пористим гелем, який захоплює дрібні молекули. Зразок розділяють на основі молекулярного розміру, причому більш крупні молекули елюються швидше, ніж молекули меншого розміру. Час утримання кожного компонента найчастіше визначають, використовуючи показник заломлення (RI), світлорозсіювання при випаровуванні (ELS) або ультрафіолетове (УФ) світло і порівнюючи з калібрувальною кривою. Отримані дані потім використовують для обчислення молекулярно-масового розподілу зразка.

Саме розподіл молекулярної маси, а не окрему молекулярну масу використовують як характеристику синтетичних полімерів. Щоб охарактеризувати цей розподіл, використовують

статистичні середні значення. Найбільш поширеними з цих середніх значень є "середньочисельна молекулярна маса" (M_n) і "середньомасова молекулярна маса" (M_w).

Способи обчислення цих значень описані в техніці, наприклад, в прикладі 9 міжнародної патентної заявки № WO 2008/073186.

5 Індекс полідисперсності або PI визначають як відношення M_w/M_n . Чим більше значення PI, тим ширшим або більш дисперсним є даний розподіл. Мінімальне значення, яке може приймати PI, дорівнює 1. Це значення представляє монодисперсний зразок, тобто полімер, всі молекули якого в розподілі мають однакову молекулярну масу.

10 Значення пікової молекулярної маси (M_p) являє собою ще одну характеристику, що визначається як вид молекулярно-масового розподілу. Вона означає молекулярну масу, яка є найбільш поширеною в даному розподілі. Це значення також дає уявлення про суть молекулярно-масового розподілу.

15 Більшість вимірювань методом GPC проводять відносно різних стандартних полімерів. Точність результатів залежить від того, наскільки близько співпадають характеристики полімеру, що аналізується, і використовуваного стандарту. Очікувана помилка у відтворюваності між різними серіями окремо каліброваних визначень становить приблизно 5-10 % і є характеристикою обмеженої точності аналізу методом GPC. Отже, результати GPC виявляються найбільш корисними, коли порівняння між молекулярно-масовими розподілами різних зразків здійснюють в процесі однієї і тієї ж серії визначень.

20 Для лігноцелюлозних зразків було потрібне отримання зразка перед аналізом методом GPC. Спочатку готували насичений розчин (8,4 мас. %) хлориду літію (LiCl) в диметилацетаміді (DMAc). Приблизно 100 мг зразки додавали до приблизно 10 г свіжоприготованого насиченого розчину LiCl в DMAc і нагрівали суміш до приблизно 150-170 °C при перемішуванні протягом 1 години. Отримані розчини звичайно мали колір від світло-жовтого до темно-жовтого.

25 Температуру розчинів знижували до приблизно 100 °C і продовжували нагрівання протягом 2 годин. Температуру розчинів потім знижували до приблизно 50 °C і нагрівали розчини зразків протягом приблизно 48-60 годин. Потрібно зазначити, що зразки, опромінені дозою 100 Мрад, легше солюбілізувались в порівнянні з необробленими аналогічними зразками. Крім того, подрібнені зразки (позначені номером 132) мали дещо менші середні молекулярні маси в порівнянні з неподрібненими зразками.

30 Отримані розчини зразків розбавляли в співвідношенні 1:1, використовуючи DMAc як розчинник, і фільтрували через фільтр з політетрафторетилену (PTFE) з розміром отворів 0,45 мкм. Профільтровані розчини зразків потім аналізували методом GPC, використовуючи параметри, описані в таблиці 7. Значення середньої пікової молекулярної маси (M_p) зразків, визначені методом гел'прониклої хроматографії (GPC), приведені в таблицях 3-6. Кожний зразок готували в двох екземплярах і кожний приготований зразок аналізували двічі (роблячи два уприскування), таким чином, для кожного зразка робили по чотири уприскування. Стандартні зразки PS1A і PS1B з полістиролу EasiCal® використовували для побудови калібрувальної кривої для шкали молекулярної маси, що складає приблизно від 580 до 750000 дальтон.

Таблиця 7

Умови аналізу методом GPC

Прилад	Waters Alliance GPC 2000
Колони (3)	Гель PL 10 мкм Серійні номери: 10-MB-148-83; 10M-MB-148-84; 10M-MB-174-129
Рухома фаза (розчинник)	0,5 % LiCl в DMAc (1,0 мл/хв.)
Температура колони/детектора	70 °C
Температура інжектора	70 °C
Розмір петлі для зразка	323,5 мкл

Приклад 7. Аналіз поверхні методом часопротітної мас-спектрометрії вторинних іонів (ToF-SIMS)

45 Часопротітна мас-спектрометрія вторинних іонів (ToF-SIMS) являла собою чутливу до поверхні спектроскопію, в якій використовували імпульсні пучок іонів (Cs або мікрофокусований Ga) для зняття молекул з найбільш зовнішньої поверхні зразка. Частинки знімали з атомних моношарів на поверхні (вторинні іони). Ці частинки потім прискорювали в "протітній трубці" і визначали їх масу, вимірюючи точний час досягнення ними детектора (тобто час прольоту). Метод ToF-SIMS надає докладну інформацію про елементарний і молекулярний склад поверхні,

тонкі шари і межі розділення зразка і забезпечує повний тривимірний аналіз. Його широко використовують, включаючи напівпровідники, полімери, фарби, покриття, скло, папір, метали, кераміку, біоматеріали, лікарські засоби і органічні тканини. Оскільки ToF-SIMS являє собою метод дослідження, він виявляє всі елементи періодичної системи, включаючи H. Дані ToF-SIMS приведені в таблицях 8-11. Використані параметри приведені в таблиці 12.

Таблиця 8

Нормовані середні інтенсивності різних досліджених позитивних іонів (нормування відносно повного рахунку іонів • 10000)

m/z	Частинки	P132		P132-10		P132-100	
		Середнє значення	σ	Середнє значення	σ	Середнє значення	σ
23	Na	257	28	276	54	193	36
27	Al	647	43	821	399	297	44
28	Si	76	45.9	197	89	81.7	10.7
15	CH ₃	77.9	7.8	161	26	133	12
27	C ₂ H ₃	448	28	720	65	718	82
39	C ₃ H ₃	333	10	463	37	474	26
41	C ₃ H ₅	703	19	820	127	900	63
43	C ₃ H ₇	657	11	757	162	924	118
115	C ₉ H ₇	73	13.4	40.3	4.5	42.5	15.7
128	C ₁₀ H ₈	55.5	11.6	26.8	4.8	27.7	6.9
73	C ₃ H ₉ Si*	181	77	65.1	18.4	81.7	7.5
147	C ₅ H ₁₅ OSi ₂ *	72.2	33.1	24.9	10.9	38.5	4
207	C ₅ H ₁₅ O ₃ Si ₃ *	17.2	7.8	6.26	3.05	7.49	1.77
647	C ₄₂ H ₆₄ PO ₃	3.63	1.05	1.43	1.41	10.7	7.2

Таблиця 9

Нормовані середні інтенсивності різних досліджених позитивних іонів (нормування відносно повного рахунку іонів • 10000)

m/z	Частинки	P132		P132-10		P132-100	
		Середнє значення	σ	Середнє значення	σ	Середнє значення	σ
19	F	15.3	2.1	42.4	37.8	19.2	1.9
35	Cl	63.8	2.8	107	33	74.1	5.5
13	CH	1900	91	1970	26	1500	6
25	C ₂ H	247	127	220	99	540	7
26	CN	18.1	2.1	48.6	30.8	43.9	1.4
42	CNO	1.16	0.71	0.743	0.711	10.8	0.9
46	NO ₂	1.87	0.38	1.66	1.65	12.8	1.8

Таблиця 10

Нормовані середні інтенсивності різних досліджених позитивних іонів (нормування відносно повного рахунку іонів • 10000)

m/z	Частинки	P-1e		P-5e		P-10e		P-30e		P-70e		P-100e	
		Середнє значення	σ	Середнє значення	σ	Середнє значення	σ	Середнє значення	σ	Середнє значення	σ	Середнє значення	σ
23	Na	232	56	370	37	241	44	518	57	350	27	542	104
27	Al	549	194	677	86	752	371	761	158	516	159	622	166
28	Si	87.3	11.3	134	24	159	100	158	32	93.7	17.1	124	11
15	CH ₃	114	23	92.9	3.9	128	18	110	16	147	16	141	5
27	C ₂ H ₃	501	205	551	59	645	165	597	152	707	94	600	55
39	C ₃ H ₃	375	80	288	8	379	82	321	57	435	61	417	32
41	C ₃ H ₅	716	123	610	24	727	182	607	93	799	112	707	84
43	C ₃ H ₇	717	121	628	52	653	172	660	89	861	113	743	73
115	C ₉ H ₇	49.9	14.6	43.8	2.6	42.2	7.9	41.4	10.1	27.7	8	32.4	10.5
128	C ₁₀ H ₈	38.8	13.1	39.2	1.9	35.2	11.8	31.9	7.8	21.2	6.1	24.2	6.8
73	C ₃ H ₉ Si*	92.5	3.0	80.6	2.9	72.3	7.7	75.3	11.4	63	3.4	55.8	2.1
147	C ₅ H ₁₅ OSi ₂ *	27.2	3.9	17.3	1.2	20.4	4.3	16.1	1.9	21.7	3.1	16.3	1.7
207	C ₅ H ₁₅ O ₃ Si ₃ *	6.05	0.74	3.71	0.18	4.51	0.55	3.54	0.37	5.31	0.59	4.08	0.28
647	C ₄₂ H ₆₄ PO ₃	1.61	1.65	1.09	1.30	0.325	0.307	nd	~	0.868	1.31	0.306	0.334

Таблиця 11

Нормовані середні інтенсивності різних досліджених позитивних іонів (нормування відносно повного рахунку іонів • 10000)

m/z	Частинки	P-1e		P-5e		P-10e		P-30e		P-70e		P-100e	
		Середнє значення	σ	Середнє значення	σ	Середнє значення	σ	Середнє значення	σ	Середнє значення	σ	Середнє значення	σ
13	CH	1950	72	1700	65	1870	91	1880	35	2000	46	2120	102
25	C ₂ H	154	47	98.8	36.3	157	4	230	17	239	22	224	19
19	F	25.4	1	24.3	1.4	74.3	18.6	40.6	14.9	25.6	1.9	21.5	2
35	Cl	39.2	13.5	38.7	3.5	46.7	5.4	67.6	6.2	45.1	2.9	32.9	10.2
26	CN	71.9	18.9	6.23	2.61	28.1	10.1	34.2	29.2	57.3	28.9	112	60
42	CNO	0.572	0.183	0.313	0.077	0.62	0.199	1.29	0.2	1.37	0.55	1.38	0.28
46	NO ₂	0.331	0.057	0.596	0.255	0.668	0.149	1.44	0.19	1.92	0.29	0.549	0.1

Таблиця 12

Параметри аналізу методом ToF-SIMS

Умови приладу:	
Прилад	PHI TRIFT II
Джерело первинних іонів	⁶⁹ Ga
Потенціал пучка первинних іонів	12 кВ для позитивних іонів 18 кВ для негативних іонів
Струм первинних іонів (постійний струм)	2 нА для зразків P#E 600 пА для зразків P132
Енергетичний фільтр/CD	Вимкнений/ввімкнений
Погашені іони	Немає
Компенсація заряду	Ввімкнена

- 5 У методі ToF-SIMS використовували фокусований імпульсний пучок частинок (звичайно Cs або Ga), щоб вибивати хімічні частинки з поверхні матеріалу. Частинки, що утворюються поблизу місця удару, частіше являли собою дисоційовані іони (позитивні або негативні). Вторинні частинки, що утворюються далі від місця удару, частіше являли собою молекулярні сполуки, як правило, фрагменти більш крупних органічних макромолекул. Частинки потім

прискорювалися на шляху прольоту до детектора. Оскільки можливе вимірювання "часу прольоту" частинок від моменту удару до детектора в наносекундній шкалі, можна забезпечити розділення маси з точністю до тисячної частинки одиниці атомної маси (тобто однієї тисячної частинки маси протона). У типових умовах роботи результати аналізу методом ToF-SIMS

5 включають: маса-спектр, що містить всю атомну масу в інтервалі від 0 до 10000 ат. од., растровий пучок, що виробляє карти будь-якої цікавлячої маси на субмікронній шкалі, і профілі глибини, отримані при зніманні з поверхні шарів, що розпилюються під дією іонного пучка. Аналіз негативних іонів показав, що полімер містив зростаючі кількості груп CNO, CN і NO₂.

Приклад 8. Порометричний аналіз опромінених матеріалів

10 Аналіз розміру і об'єму пор за допомогою ртуті (таблиця 21) оснований на нагнітанні ртуті (незмочуючій рідині) в пористу структуру при суворо регульованому тиску. Оскільки ртуть не змочує більшість речовин і не проникає мимовільно в пори під дією капілярних сил, її необхідно нагнітати в пустоти зразка, прикладаючи зовнішній тиск. Тиск, необхідний для заповнення пустот, обернено пропорційний розміру пор. Для заповнення великих пустот потрібна лише

15 невелика величина зусилля або тиску, в той час як набагато більший тиск потрібен для заповнення дуже дрібних пор.

Таблиця 21

Аналіз розподілу розміру і об'єму пор методом ртутної порометрії

Номер зразка	Повний об'єм впровадження (мл/г)	Повна поверхня пор (м ² /г)	Медіанний об'єм пор (мкм)	Медіанна площа пор (мкм)	Середній діаметр пор (4V/A) (мкм)	Об'ємна густина при абсолютному тиску 0,50 фунта на кв. дюйм або 3,5 кПа (г/мл)	Уявна (скелетна) густина (г/мл)	Пористість (%)
P132	6.0594	1.228	36.2250	13.7278	19.7415	0.1448	1.1785	87.7163
P132-10	5.5436	1.211	46.3463	4.5646	18.3106	0.1614	1.5355	89.4875
P132-100	5.3985	0.998	34.5235	18.2005	21.6422	0.1612	1.2413	87.0151
P132-181	3.2866	0.868	25.3448	12.2410	15.1509	0.2497	1.3916	82.0577
P132-US	6.0005	14.787	98.3459	0.0055	1.6231	0.1404	0.8894	84.2199
A132	2.0037	11.759	64.6308	0.0113	0.6816	0.3683	1.4058	73.7990
A132-10	1.9514	10.326	53.2706	0.0105	0.7560	0.3768	1.4231	73.5241
A132-100	1.9394	10.205	43.8966	0.0118	0.7602	0.3760	1.3889	72.9264
SG132	2.5267	8.265	57.6958	0.0141	1.2229	0.3119	1.4708	78.7961
SG132-10	2.1414	8.643	26.4666	0.0103	0.9910	0.3457	1.3315	74.0340
SG132-100	2.5142	10.766	32.7118	0.0098	0.9342	0.3077	1.3590	77.3593
SG132-10-US	4.4043	1.722	71.5734	1.1016	10.2319	0.1930	1.2883	85.0169
SG132-100-US	4.9665	7.358	24.8462	0.0089	2.6998	0.1695	1.0731	84.2010
WS132	2.9920	5.447	76.3675	0.0516	2.1971	0.2773	1.6279	82.9664
WS132-10	3.1138	2.901	57.4727	0.3630	4.2940	0.2763	1.9808	86.0484
WS132-100	3.2077	3.114	52.3284	0.2876	4.1199	0.2599	1.5611	83.3538
A-1e	1.9535	3.698	25.3411	0.0810	2.1130	0.3896	1.6299	76.0992
A-5e	1.9697	6.503	29.5954	0.0336	1.2117	0.3748	1.4317	73.8225
A-10e	2.0897	12.030	45.5493	0.0101	0.6948	0.3587	1.4321	74.9545
A-50e	2.1141	7.291	37.0760	0.0304	1.1599	0.3577	1.4677	75.6264
G-1e	2.4382	7.582	58.5521	0.0201	1.2863	0.3144	1.3472	76.6610
G-5e	2.4268	6.436	44.4848	0.0225	1.5082	0.3172	1.3782	76.9831
G-10e	2.6708	6.865	62.8605	0.0404	1.5562	0.2960	1.4140	79.0638
G-50e	2.8197	6.798	56.5048	0.0315	1.6591	0.2794	1.3179	78.7959
P-1e	7.7692	1.052	49.8844	22.9315	29.5348	0.1188	1.5443	92.3065
P-5e	7.1261	1.212	46.6400	12.3252	23.5166	0.1268	1.3160	90.3644
P-10e	6.6096	1.113	41.4252	17.4375	23.7513	0.1374	1.4906	90.7850
P-50e	6.5911	1.156	40.7837	15.9823	22.7974	0.1362	1.3302	89.7616
P-100e	5.3507	1.195	35.3622	10.7400	17.9063	0.1648	1.3948	88.1840
S	0.4362	0.030	102.8411	42.5047	57.8208	0.9334	1.5745	40.7160
S-1e	0.3900	0.632	90.6808	0.0041	2.4680	0.9772	1.5790	38.1140
S-5e	0.3914	0.337	97.1991	0.0070	4.6406	0.9858	1.6052	38.5847
S-10e	0.4179	0.349	113.4360	0.0042	4.7873	0.9469	1.5669	39.5678
S-30e	0.4616	5.329	102.0559	0.0042	0.3464	0.9065	1.5585	41.8388
S-50e	0.5217	7.162	137.2124	0.0051	0.2914	0.8521	1.5342	44.4582
S-100e	0.8817	15.217	76.4577	0.0053	0.2318	0.6478	1.5105	57.1131
St	0.6593	17.631	4.2402	0.0053	0.1496	0.7757	1.5877	51.1438
St-1e	0.6720	18.078	4.3360	0.0052	0.1487	0.7651	1.5750	51.4206
St-5e	0.6334	19.495	4.2848	0.0051	0.1300	0.7794	1.5395	49.3706
St-10e	0.6208	16.980	4.3362	0.0056	0.1462	0.7952	1.5703	49.3630
St-30e	0.6892	18.066	4.4152	0.0050	0.1526	0.7475	1.5417	51.5165
St-50e	0.6662	18.338	4.3759	0.0054	0.1453	0.7637	1.5548	50.8778
St-100e	0.6471	23.154	5.4032	0.0048	0.1118	0.7229	1.3582	46.7761

Прилад AutoPore 9520 може створювати максимальний тиск, що становить 414 МПа або 60000 фунтів на кв. дюйм. Він містить чотири камери низького тиску для приготування зразків і збирання макропорометричних даних при тиску від 0,2 фунта на кв. дюйм до 50 фунтів на кв. дюйм (1,4-350 кПа). У двох камерах високого тиску збирання даних здійснюють при тиску від 25 фунтів на кв. дюйм до 60000 фунтів на кв. дюйм (0,175-414 МПа). Зразок вміщували в чашоподібний пристрій, так званий пенетрометр, який з'єднаний зі скляним капілярним стрижнем з металевим покриттям. Коли ртуть проникла в порожнечу і оточувала зразок, вона опускалася по капілярному стрижню. Відхід ртуті з капілярного стрижня приводив до зміни електричної ємності. Цю зміну ємності під час експерименту перераховували в об'єм ртуті, знаючи об'єм стрижня використовуваного пенетрометра. Існують різноманітні пенетрометри з

різними розмірами чаші (зразка) і капілярів, щоб можна було досліджувати зразки більшості розмірів і конфігурацій. Приведена нижче таблиця 22 містить деякі ключові параметри, обчислені для кожного зразка.

Таблиця 22

Визначення параметрів

Параметр	Опис
Повний об'єм впровадження	Повний об'єм ртуті, що впроваджується під час експерименту. Він може включати заповнення пустот між дрібними частинками, пористість зразка і об'єм стиснення зразка
Повна поверхня пор	Повний об'єм впровадження, перерахований в площу в припущенні циліндричної форми пор.
Медіанний по об'єму діаметр пор	Максимальний розмір пор, що мають в сукупності 50 th % повного об'єму пор.
Медіанний по площі діаметр пор	Максимальний розмір пор, що мають в сукупності 50 th % повної поверхні пор.
Середній діаметр пор	Відношення повного об'єму пор до повної поверхні пор (4V/A).
Об'ємна густина	Відношення маси зразка до об'єму заповнення. Об'єм заповнення визначають заповненням при абсолютному тиску, що становить 0,50 фунти на кв. дюйм або 3,5 кПа.
Уявна густина	Відношення маси зразка до об'єму зразка, виміряного при максимальному абсолютному тиску, як правило, 60000 фунтів на кв. дюйм (414 МПа).
Пористість	(Об'ємна густина / Уявна густина)×100 %

5

Приклад 9. Аналіз розміру частинок опромінених матеріалів

Спосіб визначення розміру частинок по статичному світлорозсіюванню оснований на теорії Мі (Mie), яка також бере в себе теорію Фраунгофера (Fraunhofer). Теорія Мі прогнозує співвідношення інтенсивності і кута як функцію розміру для сферичних розсіюючих частинок при тій умові, що інші змінні системи є відомими і залишаються постійними. Ці змінні являють собою довжину хвилі падаючого світла і відносний показник заломлення матеріалу зразка. Застосування теорії Мі надає докладну інформацію про розмір частинок. Таблиця 23 представляє дані про розмір частинок, включаючи медіанний діаметр, середній діаметр і модальний діаметр як параметри.

10

15

Таблиця 23

Розмір частинок по лазерному світлорозсіюванню (дисперсія сухого зразка)

Номер зразка	Медіанний діаметр (мкм)	Середній діаметр (мкм)	Модальний діаметр (мкм)
A132	380.695	418.778	442.258
A132-10	321.742	366.231	410.156
A132-100	301.786	348.633	444.169
SG132	369.400	411.790	455.508
SG132-10	278.793	325.497	426.717
SG132-100	242.757	298.686	390.097
WS132	407.335	445.618	467.978
WS132-10	194.237	226.604	297.941
WS132-100	201.975	236.037	307.304

Розмір частинок визначали по лазерному світлорозсіюванню (дисперсія сухого зразка) за допомогою приладу Malvern Mastersizer 2000, використовуючи наступні умови:

Швидкість подачі: 35 %

Тиск диспергатора: 4 бар (0,4 МПа)

Оптична модель: (2.610, 1.000i), 1.000

Відповідну кількість зразка помішували на вібраційний лоток. Швидкість подачі і тиск повітря регулювали таким чином, щоб частинки були добре дисперговані. Ключовий компонент являв

20

собою вибір тиску повітря, який руйнував агрегати, але не порушував цілісність зразка. Необхідна кількість зразка змінювалася залежно від розміру частинок. Як правило, для зразків з дрібними частинками потрібна менша кількість матеріалу, ніж для зразків з крупними частинками.

5 Приклад 10. Аналіз питомої поверхні опромінених матеріалів

10 Питому поверхню кожного зразка аналізували за допомогою системи для прискореного вимірювання питомої поверхні і порометрії Micromeritics ASAP 2420. Зразки отримували попереднім дегазуванням протягом 16 годин при 40 °C. Після цього обчислювали вільний простір (в теплом і холодному стані) з гелієм і потім трубку із зразком знову відкачували, щоб
15 видалити гелій. Збирання даних починалося після цього другого відкачування і полягало у встановленні заданого тиску, що регулював кількість газу, введенного в зразок. При кожному заданому тиску визначали і записували кількість адсорбованого газу і фактичний тиск. Тиск всередині трубки із зразком вимірювали за допомогою датчика. Додаткові дози газу продовжували вводити до досягнення заданого тиску і залишали до рівноваги. Кількість адсорбованого газу визначали складанням багаторазових доз, введених в зразок. Тиск і кількість визначають ізотерму адсорбції газу і використовуються для обчислення ряду параметрів, включаючи питому поверхню по методу BET (таблиця 24).

Таблиця 24

Визначення питомої поверхні по адсорбції газу

Номер зразка	Питома поверхня в одній точці (м ² /г)	Питома поверхня по методу BET (м ² /г)	
P132	@ P/P ₀ = 0.250387771	1.5253	1.6897
P132-10	@ P/P ₀ = 0.239496722	1.0212	1.2782
P132-100	@ P/P ₀ = 0.240538100	1.0338	1.2622
P132-181	@ P/P ₀ = 0.239166091	0.5102	0.6448
P132-US	@ P/P ₀ = 0.217359072	1.0983	1.6793
A132	@ P/P ₀ = 0.240040610	0.5400	0.7614
A132-10	@ P/P ₀ = 0.211218936	0.5383	0.7212
A132-100	@ P/P ₀ = 0.238791097	0.4258	0.5538
SG132	@ P/P ₀ = 0.237989353	0.6359	0.8350
SG132-10	@ P/P ₀ = 0.238576905	0.6794	0.8689
SG132-100	@ P/P ₀ = 0.241960361	0.5518	0.7034
SG132-10-US	@ P/P ₀ = 0.225692889	0.5693	0.7510
SG132-100-US	@ P/P ₀ = 0.225935246	1.0983	1.4963

G-10-US			0.751
G100-US			1.496
G132-US			1.679
WS132	@ P/Po= 0.237823664	0.6582	0.8663
WS132-10	@ P/Po= 0.238612476	0.6191	0.7912
WS132-100	@ P/Po= 0.238398832	0.6255	0.8143
A-1e	@ P/Po=0.238098138	0.6518	0.8368
A-5e	@ P/Po=0.243184477	0.6263	0.7865
A-10e	@ P/Po=0.243163236	0.4899	0.6170
A-50e	@ P/Po=0.243225512	0.4489	0.5730
G-1e	@ P/Po=0.238496102	0.5489	0.7038
G-5e	@ P/Po=0.242792602	0.5621	0.7086
G-10e	@ P/Po=0.243066031	0.5021	0.6363
G-50e	@ P/Po=0.238291132	0.4913	0.6333
P-1e	@ P/Po=0.240842223	1.1413	1.4442
P-5e	@ P/Po=0.240789274	1.0187	1.3288
P-10e	@ P/Po=0.240116967	1.1015	1.3657
P-50e	@ P/Po=0.240072114	1.0089	1.2593
P-100e	@ P/Po=0.236541386	0.9116	1.1677
S	@ P/Po=0.225335038	0.0147	0.0279
S-1e	@ P/Po=0.217142291	0.0193	0.0372
S-5e	@ P/Po=0.133107838	0.0201	0.0485
S-10e	@ P/Po=0.244886517	0.0236	0.0317
S-30e	@ P/Po=0.237929400	0.0309	0.0428
S-50e	@ P/Po=0.245494494	0.0262	0.0365
S-100e	@ P/Po=0.224698551	0.0368	0.0506
St	@ P/Po=0.238324949	0.3126	0.4013
St-1e	@ P/Po=0.238432726	0.3254	0.4223
St-5e	@ P/Po=0.238363587	0.3106	0.4071
St-10e	@ P/Po=0.238341099	0.3205	0.4268
St-30e	@ P/Po=0.238629889	0.3118	0.4189
St-50e	@ P/Po=0.244630980	0.3119	0.3969
St-100e	@ P/Po=0.238421621	0.2932	0.3677

Модель BET для ізотерм являє собою теорію, що широко використовується для обчислення питомої поверхні. Аналіз включає визначення ємності моношару поверхні зразка шляхом обчислення кількості, необхідної для повного покривання поверхні одним щільноупакованим шаром криптону. Ємність моношару множать на площу поперечного перерізу молекули газу, що використовується в аналізі, щоб визначити повну площу поверхні. Питома поверхня являє собою відношення площі поверхні зразка до маси зразка.

Приклад 11. Визначення довжини волокон опромінених матеріалів

Дослідження розподілу волокон по довжині проводили трикратним вимірюванням представлених зразків за допомогою системи Techpar MorFi LB01. Середні значення довжини і ширина волокон представлені в таблиці 25.

Визначення довжини і ширини лігноцелюлозних волокон

Номер зразка	Середнє арифметичне (мм)	Середньозважена по довжині довжина (мм)	Статистично виправлена середньозважена по довжині довжина (мм)	Ширина (мм)
P132-10	0.484	0.615	0.773	24.7
P132-100	0.369	0.423	0.496	23.8
P132-181	0.312	0.342	0.392	24.4
A132-10	0.382	0.423	0.650	43.2
A132-100	0.362	0.435	0.592	29.9
SG132-10	0.328	0.363	0.521	44.0
SG132-100	0.325	0.351	0.466	43.8
WS132-10	0.353	0.381	0.565	44.7
WS132-100	0.354	0.371	0.536	45.4

Приклад 12. Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є (FT-IR) опроміненого і неопроміненого крафт-паперу

Аналіз методом інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є проводили за допомогою спектрометра Nicolet/Impact 400. Результати показували, що зразки P132, P132-10, P132-100, P-1e, P-5e, P-10e, P-30e, P-70e і P-100e відповідали матеріалу на основі целюлози.

Фіг. 3 представляє інфрачервоний спектр крафт-картону, подрібненого згідно з прикладом 4, в той час як фіг. 4 представляє інфрачервоний спектр крафт-картону на фіг. 3 після опромінення дозою 100 Мрад гамма-випромінювання. Опромінений зразок показує додатковий пік в області А (центр близько 1730 см^{-1}), який не виявлений в спектрі неопроміненого матеріалу. Потрібно зазначити, що було виявлене збільшення поглинання карбонільних груп близько 1650 см^{-1} при переході від P132 до P132-10 і далі до P132-100. Аналогічні результати спостерігали для зразків P-1e, P-5e, P-10e, P-30e, P-70e і P-100e.

Приклад 13. Спектри ядерного магнітного резонансу протонів і атомів вуглецю-13 (спектри ЯМР ^1H і ^{13}C) опроміненого і неопроміненого крафт-паперу

Приготування зразків

Зразки P132, P132-10, P132-100, P-1e, P-5e, P-10e, P-30e, P-70e і P-100e для аналізу готували у вигляді розчину в повністю дейтерованому диметилсульфоксиді ($\text{DMSO}-d_6$), що містить 2 % тригідрату фториду тетрабутиламонію. Зразки, які піддавали меншим дозам опромінення, виявляли значно меншу розчинність, ніж зразки, що отримали вищу дозу опромінення.

Неопромінені зразки утворювали гель в цій системі розчинника, але нагрівання до 60°C приводило до розрізнення піків в спектрі ЯМР. Зразки, що отримали вищі дози опромінення, були розчинні при концентрації 10 мас. %.

Аналіз

Спектри ЯМР ^1H зразків в концентрації 15 мг/мл показали дуже широкий відмітний пік резонансу з центром при 16 м. ч. (фіг. 5A-5J). Цей пік є характерним для рухомого протона ОН-групи, що було підтверджено струшуванням з "важкою водою D_2O ". Аналіз модельних сполук (ацетилацетон, глюкуронова кислота і кетоглуконова кислота) переконливо показав, що цей пік був дійсно зумовлений рухомим енольним протоном. Цей передбачуваний енольний пік був дуже чутливим до концентрації, і автори не змогли встановити, чи був резонансний сигнал зумовлений енолом або, можливо, карбоною кислотою.

Резонансні сигнали протонів карбоксильних груп модельних сполук були аналогічні тим, які спостерігали для зразків необробленої целюлози. Ці модельні сполуки показували сильнопольний зсув приблизно на 5-6 м. ч. Приготування зразка P-100e з більш високою концентрацією (~10 мас. %) привело до різкого слабкопольного зсуву в область сигналів карбоксильних кислот модельних сполук (~6 м. ч.) (фіг. 5N). Ці результати привели до висновку про те, що цей резонансний сигнал не є надійною характеристикою даної функціональної групи,

однак дані показують, що кількість рухомих атомів водню збільшується при збільшенні дози опромінення зразка. Крім того, вінільні протони не були виявлені.

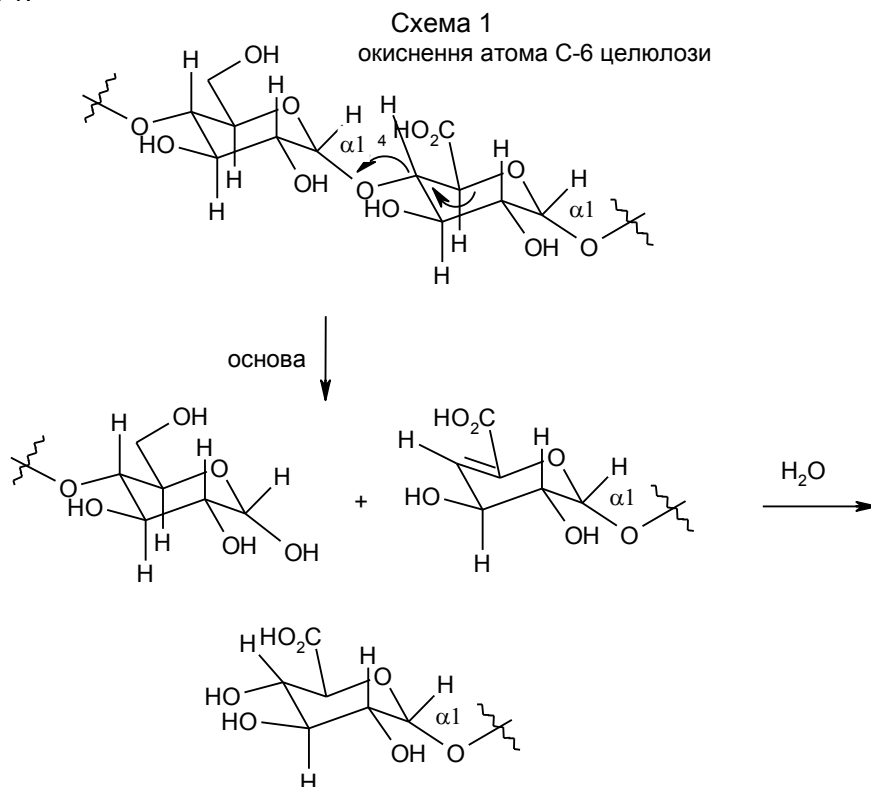
Спектри ЯМР ^{13}C зразків підтверджують присутність карбонільної групи карбонової кислоти або похідного карбонової кислоти. Цей новий пік (при 168 м. ч.) не присутній в спектрі необроблених зразків (фіг. 5К). Спектр ЯМР з тривалою затримкою дозволив кількісно визначити даний сигнал для зразка Р-100е (фіг. 5L-5М). Порівняння інтегрування сигналу карбонільної групи з сигналами близько 100 13,8, що приблизно відповідає одній карбонільній групі на 14 ланок глюкози. Хімічний зсув при 100 м. ч. добре відповідає глюкуроновій кислоті.

Титрування

Зразки Р-100е і Р132-100 (1 г) суспендували в деіонізованій воді (25 мл). При перемішуванні до кожного зразка додавали індикатор алізаріновий жовтий. Зразок Р-100е змочувався з великим зусиллям. Обидва зразки титрували розчином 0,2 М NaOH. Кінцеву точку ледве визначали і значення рН підтверджували за допомогою індикаторного паперу. Вихідне значення рН зразків становило приблизно 4 для обох зразків. Для зразка Р132-100 було потрібно 0,4 міліеквівалента гідроксиду, що дає молекулярну масу карбонової кислоти, яка дорівнює 2500 ат. од. Якщо вважати масу мономера як 180 ат. од., то одна карбоксильна група буде доводитися на 13,9 мономерних ланок. Аналогічним чином, для зразка Р-100е було потрібно 3,2 міліеквівалента гідроксиду, що відповідає одній карбоксильній групі на 17,4 мономерних ланок.

Висновки

Атом вуглецю С-6 целюлози, мабуть, окиснюється в карбонову кислоту (похідне глюкуронової кислоти), причому окиснення є несподівано специфічним. Це окиснення узгоджується зі смугою близько 1740 см^{-1} в інфрачервоному спектрі, інтенсивність якої зростає при опроміненні і яка відповідає аліфатичній карбонової кислоти. Результати титрування узгодяться з кількісним методом аналізу ЯМР ^{13}C . Збільшення розчинності зразка при вищих рівнях опромінення узгоджується із збільшенням кількості карбонових кислот протонів. Передбачуваний механізм розкладання целюлози з "окисненням атома С-6" представлений нижче на схемі 1.



Приклад 14. Мікробне випробування попередньо обробленої біомаси

Певні лігноцелюлозні матеріали, попередньо оброблені згідно з описом в даному документі, аналізували на токсичність відносно звичайних штамів дріжджів і бактерій, що використовується в біопаливній промисловості на стадії ферментації у виробництві етанолу. Крім того, досліджували вміст цукру і сумісність з целюлазними ферментами, щоб визначити можливість здійснення даного способу обробки. Випробування попередньо оброблених матеріалів проводили в дві фази таким чином.

Фаза 1. Токсичність і вміст цукру

Токсичність попередньо оброблених трав і паперу як вихідних матеріалів вимірювали відносно дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (винні дріжджі) і *Pichia stipitis* (ATCC 66278), а також бактерій *Zymomonas mobilis* (ATCC 31821) і *Clostridium thermocellum* (ATCC 31924). Дослідження зростання здійснювали для кожного з даних мікроорганізмів, щоб визначити оптимальний час інкубації і відбирання проб.

Кожний з вихідних матеріалів потім інкубували в двох екземплярах, використовуючи *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Zymomonas mobilis* і *Clostridium thermocellum* в стандартному мікробіологічному середовищі для кожного організму. Солодово-дріжджовий (YM) бульйон використовували для двох штамів дріжджів, включаючи *Saccharomyces cerevisiae* і *Pichia stipitis*.

Регенеративне середовище (RM) використовували для *Zymomonas mobilis* і культурну середу (CM4) використовували для *Clostridium thermocellum*. Для порівняння використовували позитивний контрольний зразок з додаванням чистого цукру, але без вихідного матеріалу. У процесі інкубації протягом 12-годинного періоду відбирали п'ять зразків через 0, 3, 6, 9, і 12 годин і аналізували їх на життєздатність (чашковий підрахунок для *Zymomonas mobilis* і прямий підрахунок для *Saccharomyces cerevisiae*) і концентрацію етанолу.

Вміст цукру у вихідних матеріалах вимірювали методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC), використовуючи колону Shodex™ Sugar SP0810 або Biorad® HPX-87P. Кожний з вихідних матеріалів (приблизно 5 г) змішували з очищеною зворотним осмосом (RO) водою протягом 1 години. Рідку частину суміші відділяли і аналізували на вміст глюкози, галактози, ксилози, манози, арабінози і целобіози. Аналіз здійснювали згідно з методикою Національного біоенергетичного центра для визначення структурних вуглеводів і лігніну в біомасі.

Фаза 2. Сумісність целюлази

Вихідні матеріали випробовували в двох екземплярах з продуктом Accellerase®, що є в продажу 1000, який містить комплекс ферментів, які відновлюють лігноцелюлозну біомасу в цукри, що ферментуються, при рекомендованій температурі і концентрації в конічній колбі Ерленмеєра. Колби інкубували при помірному струшуванні зі швидкістю близько 200 об./хв. протягом 12 годин. Протягом цього часу зразки відбирали кожні три години (через 0, 3, 6, 9 і 12 годин), щоб визначати концентрацію цукрів, що відновлюються, (Hope і Dean, Biotech J. (Журнал біотехнології), 1974 р., т. 144, с. 403) в рідкій частині вмісту колб.

Приклад 15. Аналіз концентрації цукру методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC)

Аналізували 13 зразків на концентрацію цукру (HPLC) і токсичність відносно трьох мікроорганізмів (*Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae* і *Zymomonas mobilis*).

Таблиця 26 містить список обладнання, використаного для даних експериментів. Таблиці 27 і 28 представляють списки цукрів (із вказуванням постачальників і номерів партій), використаного в приготуванні стандартів для методу HPLC, і протокол, використаний в приготуванні стандарту для методу HPLC, відповідно.

Таблиця 26

Обладнання, використане в експериментах

Обладнання	Виробник і модель обладнання
Вимірювач pH (pH-метр)	Orion
Струшувачі (2)	B. Braun Biotech, Certomat BS-1
Високоефективний рідинний хроматограф	Waters, модуль 2690 HPLC
Спектрофотометр	Unicam, UV300
Біохімічний аналізатор YSI	Interscience, YSI

Таблиця 27

Цукри, використані в аналізі методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ)

Цукор	виробник	Ref #	Номер партії
глюкоза	BioChemika	49140	1284892
ксилоза		95731	1304473 51707231
целобіоза		22150	1303157 14806191
арабіноза		10840	1188979 24105272
маноза		63582	363063/1 22097
галактоза		48259	46032/1 33197

Таблиця 28

Отримання стандартів для методу ВЕРХ

Концентрація, що вимагається (мг/мл)	Об'єм розчину цукру	Об'єм наночистої води (мл)	Повний об'єм (мл)
4	50 мл of 4 мг/мл	0	50
2	25 мл of 4 мг/мл	25	50
1	25 мл of 2 мг/мл	25	50
0.5	25 мл of 1 мг/мл	25	50
0.1	5 мл of 1 мг/мл	20	25
Перевірочний стандарт	18.75 мл of 4 мг/мл	31.25	50
1.5 мг/мл	мг/мл		

Аналіз

- 5 Кожний зразок (1 г) перемішували протягом ночі з очищеною зворотним осмосом водою при 200 об./хв. і 50 °С. Значення рН зразка доводили до 5-6 і фільтрували через шприц-фільтр з отвором 0,2 мкм. Зразки зберігали при -20 °С перед аналізом, щоб забезпечити цілісність зразків. Результати спостережень, зроблених під час приготування зразків, представлені в таблиці 29.

10

Таблиця 29

Спостереження під час приготування зразків для ВЕРХ

Зразок	Використана кількість (г)	Додана вода (мл)	pH	Спостереження
P132	1	30	5.38	Крихкий, ледве перемішується Крихкий, ледве перемішується Низьке значення pH із зусиллям доводиться до 5,0 при додаванні 10 N NaOH
P132-10	1	25	6.77	
P132-100	1	20	3.19	
P132-US	0.3	5	6.14	
A132	1	15	5.52	
A132-10	1	15	4.9	
A132-100	1	15	5.39	
SG132	1	15	5.59	
SG132-10	1	15	5.16	
SG132-100	1	15	4.7	
SG132-10-US	0.3	5	5.12	
SG132-100-US	0.3	5	4.97	
WS132	1	15	5.63	
WS132-10	1	15	5.43	
WS132-100	1	15	5.02	

*Значення pH даних зразків доводили до даного рівня, використовуючи 1 N NaOH

Готували свіжі стандарти, використовуючи вихідний розчин, що містить 4 мг/мл суміші шести цукрів (глюкоза, ксилоза, целобіоза, арабіноза, маноза і галактоза). Вихідний розчин готували розчиненням по 0,400 г кожного цукру в 75 мл наночистої води (фільтр 0,3 мкм). Після приготування вихідний розчин розбавляли до 100 мл, використовуючи мірну колбу, і зберігали при -20 °C. Робочі стандартні розчини з концентраціями 0,1, 0,5, 1, 2 і 4 мг/мл готували послідовним розбавленням вихідного розчину наночистою водою. Крім того, перевірочний стандартний розчин з концентрацією 1,5 мг/мл також готували з вихідного розчину.

Концентрації цукру аналізували згідно з методикою визначення структурних вуглеводів в біомасі (програма по біомасі NREL, 2006 р.), причому дана методика у всій своїй повноті включена в даний документ за допомогою посилання. Використовували колону Shodex Sugar SP0810 з випарним детектором світлорозсіювання. Перевірочний стандарт (концентрація 1,5 мг/мл) аналізували через кожні 8 вприскувань, щоб пересвідчитися в збереженні справності колони і детектора під час експерименту. Коефіцієнт варіації стандартної кривої (значення R2) становив щонайменше 0,989, і концентрація перевірочних стандартних розчинів знаходилася в межах 10 % від фактичної концентрації. Аналіз методом HPLC проводили в наступних умовах:

Таблиця 30

Параметри вискоефективної рідинної хроматографії (HPLC)

Вприскуваний об'єм	20мкл
Рухома фаза	наночиста вода*, фільтрована через отвори 0,45 мкм і дегазована
Швидкість потоку	0,5 мл/хв.
Температура колони	85 °C
Температура детектора	Температура випарника 110 °C, температура розпилювача 90 °C

*Первинні дослідження показали, що краще розділення досягнуто при використанні наночистої води, а не суміші ацетонітрилу і води в співвідношенні 15/85 як рухомої фази (виробник не рекомендує використання більше ніж 20 % ацетонітрилу в даній колоні).

Результати

Результати аналізу методом HPLC представлені в таблицях 31, 32 і 33.

Таблиця 31

Концентрація цукру, виражена в мг/мл і мг/г екстракту

Номер зразка	Моносахарид ксиліоза $C_5H_{10}O_5$ (MM=150)		Моносахарид арабіноза $C_5H_{10}O_5$ (MM=150)		Моносахарид глюкоза $C_6H_{12}O_6$ (MM=180)		Галактоза (див. глюкозу) мг/мл, мг/г		маноза (див. глюкозу) мг/мл, мг/г		Дисахарид целобіоза $C_{12}H_{22}O_{11}$ (MM=342)	
	мг/мл	мг/г	мг/мл	мг/г	мг/мл	мг/г	мг/мл	мг/г	мг/мл	мг/г	мг/мл	мг/г
P												
P-132	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P-132-10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.34	8.60	0.00	0.00	0.00	0.00	00.33	8.13
P-132-100	0.35	7.04	0.00	0.00	0.34	6.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.36	7.20
P-132-BR	0.35	5.80	0.43	7.17	0.34	5.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G												
G-132	0.39	5.88	0.38	5.73	0.84	12.66	0.34	5.04	0.92	13.76	0.00	0.00
G-132-10	0.50	7.50	0.41	6.18	1.07	16.04	0.35	5.19	0.98	14.66	0.00	0.00
G-132-100	0.00	0.00	0.37	5.54	0.41	6.14	0.00	0.00	0.55	8.28	0.45	6.71
G-132-10-US	0.34	5.73	0.39	6.45	0.33	5.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G-132-100-US	0.00	0.00	0.37	6.22	0.35	5.90	0.33	5.43	0.40	6.70	0.39	6.45
A												
A-132	1.36	20.39	0.00	0.00	1.08	16.22	0.39	5.84	1.07	16.02	0.00	0.00
A-132-10	1.19	17.87	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37	5.52	0.00	0.00
A-132-100	1.07	16.11	0.00	0.00	0.35	5.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.81	12.2
WS												
WS-132	0.49	7.41	0.41	6.15	0.39	5.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
WS-132-10	0.57	8.49	0.40	5.99	0.73	10.95	0.34	5.07	0.50	7.55	0.00	0.00
WS-132-100	0.43	6.39	0.37	5.51	0.36	5.36	0.00	0.00	0.36	5.33	0.35	5.25

5

Таблиця 32

Концентрація цукру, виражена в % від маси паперу

Концентрація цукру (%сухого зразка)	P132 P132-10 P132-100 P132-US			
Целобіоза	0.00	0.81	0.72	0.00
глюкоза	0.00	0.86	0.67	0.56
ксилоза	0.00	0.00	0.70	0.58
галактоза	0.00	0.00	0.00	0.00
арабіноза	0.00	0.00	0.00	0.72
маноза	0.00	0.00	0.00	0.00

Таблиця 33

Концентрація цукру, виражена в % від повної маси зразка

Концентрація цукру (%сухого зразка)	A132 A132-10 A132-100			SG132 SG132-10 SG132-100			SG132-10-US SG132-100-US		WS132 WS132-10 WS132-100		
Целобіоза	0.00	0.00	1.22	0.00	0.00	0.67	0.00	0.65	0.00	0.00	0.53
глюкоза	1.62	0.00	0.52	1.27	1.60	0.61	0.54	0.59	0.59	1.10	0.54
ксилоза	2.04	1.79	1.61	0.59	0.75	0.00	0.57	0.00	0.74	0.85	0.64
галактоза	0.58	0.00	0.00	0.50	0.52	0.00	0.00	0.54	0.00	0.51	0.00
арабіноза	0.00	0.00	0.00	0.57	0.62	0.55	0.65	0.62	0.62	0.60	0.55
маноза	1.60	0.55	0.00	1.38	1.47	0.83	0.00	0.67	0.00	0.76	0.53

Приклад 16. Дослідження токсичності

- Дванадцять зразків аналізували на токсичність відносно набору з трьох виробляючих етанол культур. У даному дослідженні в зразки додавали глюкозу, щоб зробити відмінність між вирощуванням клітин культур на мінімальному середовищі і токсичністю зразків. Тринадцятий зразок випробовували на токсичність відносно *Pichia stipitis*. Короткий опис використаної методики приведений в таблиці 32. Опис використаних хімічних речовин і обладнання для випробування токсичності приведений в таблицях 34-36.

Таблиця 34

Умови випробування токсичності

Параметр	Організм...		
	<i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 31821	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 24858	<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124
Повторення випробування	Двократне		
Об'єм інокуляції (мл)	1	0.1	1
Температура інкубації	30 °C	25 °C	25 °C
Швидкість струшування (об/хв.)	125	200	125
Об'єм колби Ерленмеєра	250 мл	500 мл	250 мл
Об'єм середовища	100 мл	100 мл	100 мл
Повний час інкубації (годин)	36	36	48
Час аналізу на етанол (годин)	24, 30, 36	24, 30, 36	24, 36, 48
Час рахування клітин (годин)	24, 36	24, 36	24, 48
pH	0 годин	0 годин	0 годин

Таблиця 35

Реагенти, використані для випробування токсичності

Компонент середовища	Виробник	Реєстраційний номер	Номер партії
Сечовина	ScholAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Азотиста основа	Becton Dickinson	291940	7128171
дріжджів	Becton Dickinson	211677	4303198
Пептон	Fluka	95731	1304473
Ксилоза	Sigma	G-5400	51707231
Глюкоза	Sigma	G-5400	107H0245
Екстракт дріжджів (використаний для <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Becton Dickinson	288620	4026828
Екстракт дріжджів (використаний для <i>Pichia stipitis</i> і <i>Zymomonas mobilis</i>)	Becton Dickinson	212750	7165593
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Sigma	M5921	034K0066
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma	A4418	117K5421
KH ₂ PO ₄	Sigma	P5379	074K0160
Солодово-дріжджовий бульйон	Becton Dickinson	271120	6278265

Таблиця 36

Компоненти YSI, використовувані у дослідженні із струшуванням колби

Компонент	Номер по каталогу	Номер партії
Мембрана для етанолу YSI	2786	07L100153
Стандарт етанолу YSI (3,2 г/л)	2790	012711040
Буфер в етанолі YSI	2787	07M1000053, 07100215

Випробування проводили з використанням трьох мікроорганізмів, як описано нижче.

Saccharomyces cerevisiae ATCC 24858 (з колекції типових культур США)

Культуру *Saccharomyces cerevisiae* на скошеному середовищі готували з регідратованої ліофілізованої культури, отриманої з ATCC. Порцію матеріалу культури на скошеному середовищі висівали штрихом на солодово-дріжджовий бульйон+20 г/л агар (pH 5,0) і інкубували при 30 °C протягом 2 діб. Колбу Ерленмеєра об'ємом 250 мл, що містить 50 мл середовища (20 г/л глюкози, 3 г/л екстракту дріжджів і 5,0 г/л пептону, pH 5,0) інокулювали однією колонією з чашки з солодово-дріжджовим бульйоном і інкубували протягом 24 годин при 25 °C і 200 об./хв. Після 23 годин росту зразок витягували і вимірювали його оптичну густину (600 нм в ультрафіолетовому спектрофотометрі) і чистоту (барвник Грама (Gram)). На основі цих результатів одну колбу (так звану колбу для посіву) з оптичною густиною (OD), що дорівнює 14,8, і чистим барвником Грама вибирали для інокуляції всіх досліджуваних колб.

Досліджувані посудини являли собою колби Ерленмеєра об'ємом 500 мл, що містять 100 мл стерильного середовища, описаного вище. Всі колби витримували в автоклаві при температурі 121 °C і тиску 15 фунтів на кв. дюйм (0,1 МПа) перед додаванням досліджуваних матеріалів. Досліджувані матеріали не стерилізували, тому що обробка в автоклаві змінює вміст зразків. Досліджувані зразки додавали під час інокуляції (а не перед нею), щоб зменшити можливість забруднення. Крім досліджуваних зразків по 1 мл (1 об. %) матеріалу з колби для посіву додавали в кожен колбу. Колби інкубували, як описано вище, протягом 36 годин.

Pichia stipitis NRRL Y-7124 (з колекції культур ARS)

Культуру *Pichia stipitis* на скошеному середовищі готували з регідратованої ліофілізованої культури, отриманої з колекції культур ARS. Порцію матеріалу культури на скошеному середовищі висівали штрихом на солодово-дріжджовий бульйон+20 г/л агар (pH 5,0) і інкубували при 30 °C протягом 2 діб. Колбу Ерленмеєра об'ємом 250 мл, що містить 100 мл середовища (40 г/л глюкози, 1,7 г/л азотистої основи дріжджів, 2,27 г/л сечовини, 6,56 г/л пептону, 40 г/л ксилози, pH 5,0) інокулювали з невеликою кількістю матеріалу з чашки і інкубували протягом 24 годин при 25 °C і 125 об./хв... Після 23 годин росту зразок витягували і вимірювали його оптичну густину (600 нм в ультрафіолетовому спектрофотометрі) і чистоту (барвник Грама). На основі цих результатів одну колбу (так звану колбу для посіву) з оптичною густиною 5,23 і з чистим барвником Грама вибирали для інокуляції всіх досліджуваних колб.

Досліджувані посудинами являли собою колби Ерленмеєра об'ємом 250 мл, що містять 100 мл стерильного середовища, описаного вище. Всі пусті колби витримували в автоклаві при температурі 121 °C і тиску 15 фунтів на кв. дюйм (0,1 МПа) і додавали середовище, стерилізоване на фільтрі з отворами 0,22 мкм, перед додаванням досліджуваних матеріалів. Досліджувані матеріали не стерилізували, тому що обробка в автоклаві змінює вміст зразків, а стерилізація на фільтрі непридатна для стерилізації твердих речовин. Досліджувані зразки додавали під час інокуляції (а не перед нею), щоб зменшити можливість забруднення. Крім досліджуваних зразків по 1 мл (1 об. %) матеріалу з колби для посіву додавали в кожен колбу. Колби інкубували, як описано вище, протягом 48 годин.

Zymomonas mobilis ATCC 31821 з (колекції типових культур США)

Культуру *Zymomonas mobilis* на скошеному середовищі готували з регідратованої ліофілізованої культури, отриманої з ATCC. Порцію матеріалу культури на скошеному середовищі висівали штрихом на фарбувальні чашки (глюкоза 20 г/л, екстракт дріжджів 10 г/л, агар 20 г/л, pH 5,4) і інкубували при 30 °C в атмосфері, що містить 5 % CO₂, протягом 2 діб. Пробірку об'ємом 20 мл з гвинтовою кришкою, що містить 15 мл середовища (25 г/л глюкози, 10 г/л екстракту дріжджів, 1 г/л MgSO₄·7H₂O, 1 г/л (NH₄)₂SO₄, 2 г/л KH₂PO₄, pH 5,4) інокулювали однією колонією і інкубували протягом 24 годин при 30 °C без струшування. Після 23 годин росту зразок витягували і вимірювали його оптичну густину (600 нм в ультрафіолетовому спектрофотометрі) і чистоту (барвник Грама). На основі цих результатів одну пробірку (OD=1,96) вибирали, щоб інокулювати другу колбу для посіву. Друга колба для посіву являла собою колбу об'ємом 125 мл, що містить 70 мл середовища, описаного вище, і інокулювали 700 мкл (1 об. %) і інкубували протягом 24 годин при 30 °C без струшування. Після 23 годин росту зразок витягували і вимірювали його оптичну густину (600 нм в ультрафіолетовому спектрофотометрі) і чистоту (барвник Грама). На основі цих результатів одну колбу (так звану колбу для посіву) з OD=3,72 вибирали для інокуляції всіх досліджуваних колб.

Досліджувані посудини являли собою колби Ерленмеєра об'ємом 250 мл, що містять 100 мл стерильного середовища, описаного вище, за винятком 5 г/л екстракту дріжджів. Всі пусті колби витримували в автоклаві при температурі 121 °C і тиску 15 фунтів на кв. дюйм (0,1 МПа) і додавали середовище, стерилізоване на фільтрі з отворами 0,22 мкм, перед додаванням

досліджуваних матеріалів. Досліджувані матеріали не стерилізували, тому що обробка в автоклаві змінює вміст зразків, а стерилізація на фільтрі непридатна для стерилізації твердих речовин. Досліджувані зразки додавали під час інокуляції, щоб зменшити можливість забруднення. Крім досліджуваних зразків по 1 мл (1 об. %) матеріалу з колби для посіву

5 додавали в кожну колбу. Колби інкубували, як описано вище, протягом 36 годин

Аналіз

У двох зразках аналізували концентрацію клітин, використовуючи розподіл по чашці для *Zygomonas mobilis* і прямий рахунок (гемоцитометр і мікроскоп) для *Saccharomyces cerevisiae* і *Pichia stipitis*. Відповідним чином розбавлені зразки *Zygomonas mobilis* розподіляли на чашки з

10 декстрозним екстрактом дріжджів (глюкоза 20 г/л, екстракт дріжджів 10 г/л, агар 20 г/л, pH 5,4), інкубували при 30 °C в атмосфері, що містить 5 % CO₂, протягом 2 діб і рахували число колоній. Відповідним чином розбавлені зразки *Saccharomyces cerevisiae* і *Pichia stipitis* змішували з 0,05 % трипанового синього і завантажували в гемоцитометр Нойбауера (Neubauer). Клітини

15 рахували при 40-кратному збільшенні.
У трьох зразках аналізували концентрацію етанолу, використовуючи біохімічний аналізатор YSI на основі аналізу алкогольдегідрогенази (YSI, Interscience). Зразки центрифугували зі швидкістю 14000 об./хв. протягом 20 хвилин і збирали надосадову рідину при -20 °C для збереження цілісності. Перед аналізом зразки розбавляли до концентрації, що становить 0-3,2 г/л етанолу. Стандартний розчин, що містить 3,2 г/л етанолу, аналізували приблизно через

20 кожні 30 зразків, щоб пересвідчитися в збереженні цілісності мембрани в процесі аналізу. Оптична густина (600 нм) зразків не повідомляється, тому що тверді досліджувані зразки перешкождали вимірюванню поглинання шляхом збільшення каламутності зразків, і результати є неточними.

Результати аналізу етанолу

Ефективність використовували для порівняння кожного зразка з контрольним зразком для кожного мікроорганізму (таблиці 37-39). Однак процентну ефективність не можна використати для порівняння штамів. При порівнянні штамів потрібно використовувати повну концентрацію етанолу. При аналізі даних процентна ефективність, що складає менше ніж 80 %, може вказувати на токсичність, якщо це супроводжується низьким числом клітин. Для визначення

30 процентної ефективності використовують наступне рівняння:

Процентна ефективність=(вміст етанолу в даному зразку/вміст етанолу в контрольному зразку)×100

Таблиця 37

Концентрація етанолу і процентна
ефективність при використанні *Saccharomyces cerevisiae*

Номер зразка	24 години		30 годин		36 годин	
	Концентрація етанолу (г/л)	Ефективність (%)	Концентрація етанолу (г/л)	Ефективність (%)	Концентрація етанолу (г/л)	Ефективність (%)
P132	4.0	140	5.2	127	3.26	176
P132-10	4.2	147	5.1	125	3.86	209
P132-100	4.3	149	5.6	136	3.47	187
A132	5.5	191	6.5	160	5.24	283
A132-10	1.9	67	6.3	153	5.54	299
A132-100	4.4	154	5.6	137	4.04	218
G132	5.3	186	6.0	146	3.99	215
G132-10	5.2	180	6.4	156	4.63	250
G132-100	5.5	191	6.3	155	4.60	248
WS132	4.8	168	6.3	155	4.51	244
WS132-10	4.9	172	6.0	146	4.55	246
WS132-100	4.9	170	5.7	140	4.71	254
Контроль	2.9	100	4.1	100	1.85	100

Таблиця 38

Концентрація етанолу і процентна ефективність при використанні *Pichia stipitis*

Номер зразка	24 години		36 годин		48 годин	
	Концентрація етанолу (г/л)	Ефективність (%)	Концентрація етанолу (г/л)	Ефективність (%)	Концентрація етанолу (г/л)	Ефективність (%)
P132	2.8	130	3.4	188	8.1	176
P132-10	7.3	344	11.9	655	15.8	342
P132-100	5.2	247	8.6	472	13.3	288
A132	12.2	575	14.7	812	14.9	324
A132-10	15.1	710	18.7	1033	26.0	565
A132-100	10.9	514	16.7	923	22.2	483
G132	8.0	375	12.9	713	13.3	288
G132-10	10.1	476	16.0	884	22.3	485
G132-100	8.6	406	15.2	837	21.6	470
WS132	9.8	460	14.9	820	17.9	389
WS132-10	7.8	370	16.1	890	19.3	418
WS132-100	9.1	429	15.0	829	15.1	328
Зразок А*	13.2	156	19.0	166	20.6	160
Контроль	2.1	100	1.8	100	4.6	100

Виділені жирним шрифтом зразки представляли собою найкращі виробники етанолу, концентрація якого перевищувала 20 г/л і була аналогічною концентраціям в деревних гідролізатах (H. K. Sreenath і T. W. Jeffries, Biosource Technology (Технологія біоджерел), 2000 р., т. 72, с. 253-260). *Аналіз в наступному експерименті зі струшуванням колбою.

Таблиця 39

Концентрація етанолу і процентна ефективність при використанні *Zymomonas mobilis*

Номер зразка	24 години		30 годин		36 годин	
	Концентрація етанолу (г/л)	Ефективність (%)	Концентрація етанолу (г/л)	Ефективність (%)	Концентрація етанолу (г/л)	Ефективність (%)
P132	7.5	85	6.8	84	7.5	93
P132-10	7.5	85	4.8	59	6.8	84
P132-100	7.3	83	6.2	77	7.1	88
A132	9.6	109	8.3	103	9.1	112
A132-10	9.2	105	8.4	105	8.8	109
A132-100	8.2	93	7.6	94	7.6	93
WS132	7.9	89	7.1	88	7.7	94
WS132-10	8.2	93	6.8	85	7.3	90
WS132-100	8.7	98	6.9	86	8.3	102
G132	8.7	99	7.1	88	8.1	99
G132-10	7.8	88	7.0	88	7.3	90
G132-100	8.6	98	7.8	98	8.3	102
Контроль	8.8	100	8.0	100	8.1	100

Результати аналізу концентрації клітин

- 5 Процентну концентрацію клітин використовують для порівняння кожного зразка з контрольним зразком для кожного мікроорганізму (таблиці 40-42). Однак процентну концентрацію клітин не можна використовувати для порівняння штамів. При порівнянні штамів потрібно використовувати повну концентрацію клітин. При аналізі даних процентна ефективність, що складає менше ніж 70 %, може вказувати на токсичність, коли вона супроводжується низькою концентрацією етанолу. Для визначення процентної концентрації клітин використовують наступне рівняння:

10 Процентна концентрація клітин = (число клітин в даному зразку/число клітин в контрольному зразку)×100

Таблиця 40

Результати аналізу концентрації клітин для *Saccharomyces cerevisiae*

Номер зразка	24 години		36 годин	
	Концентрація клітин ($\times 10^8$ /мл)	% клітин	Концентрація клітин ($\times 10^8$ /мл)	% клітин
P132	1.99	166	2.51	83
P132-10	2.51	209	1.91	63
P132-100	1.35	113	1.99	66
A132	3.80	316	2.59	85
A132-10	1.73	144	3.90	129
A132-100	3.98	331	2.51	83
G132	2.14	178	3.12	103
G132-10	2.33	194	2.59	85
G132-100	3.57	298	2.66	88
WS132	4.10	341	2.66	88
WS132-10	2.63	219	2.81	93
WS132-100	2.29	191	2.40	79
Контроль	1.20	100	3.03	100

Таблиця 41

Результати аналізу концентрації клітин для *Pichia Stipitis*

Номер зразка	24 години		48 годин	
	Концентрація клітин ($\times 10^8$ /мл)	% клітин	Концентрація клітин ($\times 10^8$ /мл)	% клітин
P132	16.4	108	20.3	87
P132-10	11.5	76	9.5	41
P132-100	6.5	43	17.8	76
A132	7.1	47	10.2	44
A132-10	12.7	84	9.3	40
A132-100	11.8	78	18.3	78
G132	4.5	30	4.8	21
G132-10	22.8	151	9.8	42
G132-100	10.1	67	21.7	93
WS132	17.6	117	8.2	35
WS132-10	5.3	35	10.8	46
WS132-100	9.3	62	10.7	46
Контроль	15.1	100	23.4	100

Таблиця 42

Результати аналізу концентрації клітин для *Zygomonas mobilis*

Номер зразка	24 години		36 годин	
	Концентрація клітин ($\times 10^8$ /мл)	% клітин	Концентрація клітин ($\times 10^8$ /мл)	% клітин
P132	7.08	86	2.97	66
P132-10	21.80	264	4.37	98
P132-100	4.50	54	3.35	75
A132	6.95	84	1.99	44
A132-10	6.13	74	4.05	91
A132-100	9.60	116	4.20	94
G132	7.48	90	3.84	86
G132-10	14.75	178	2.89	65
G132-100	6.00	72	2.55	57
WS132	9.70	117	4.55	102
WS132-10	13.20	160	4.32	97
WS132-100	5.15	62	2.89	65
Контроль	8.27	100	4.47	100

Приклад 17. Ферментація зразків целюлози при струшуванні в колбі з використанням *Pichia stipitis*

5 Суть експерименту

Тринадцять зразків випробовували у виробництві етанолу з використанням культури *Pichia stipitis* без додавання цукру. Їх випробовували в присутності і за відсутності целюлази (комплексний фермент Accellerase 1000® від фірми Genencor). Обладнання і реагенти, використані для експериментів, перераховані нижче в таблицях 43-45.

10

Таблиця 43

Обладнання і періодичність обслуговування

Обладнання	Виробник і модель	Періодичність обслуговування
Струшувач (2)	B. Braun Biotech, Certomat BS-1	Щоквартальне
Спектрофотометр	Unicam, UV300	Піврічне
Біохімічний аналізатор YSI	Interscience, YSI	Щомісячне

Таблиця 44

Компоненти YSI, що використовуються в дослідженні зі струшуванням колби

Компонент	Номер по каталогу	Номер партії
Мембрана для етанолу YSI	2786	07L100153
Стандартний розчин етанолу YSI (3,2 г/л)	2790	012711040
Буферний розчин в етанолі YSI	2787	07M1000053, 07100215

Хімічні речовини, що використовуються в дослідженні зі струшуванням колби

Компонент середовища	Виробник	Реєстраційний номер	Номер партії
Сечовина	ScholAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Азотиста основа дріжджів	Becton Dickinson	291940	7128171
Пептон	Becton Dickinson	211677	4303198
Солодово-дріжджовий бульйон	Becton Dickinson	271120	6278265
Комплексний фермент Accellerase®	Genencor	Accellerase® 1000	1600794133
Ксилоза	BioChemika	95731	1304473
Глюкоза	Sigma	G-5400	51707231 107H0245

Культуру *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 на скошеному середовищі готували з регідратованої ліофілізованої культури, отриманої з колекції культур ARS. Порцію матеріалу культури на скошеному середовищі, висівали штрихом на солодово-дріжджовий бульйон (YM)+20 г/л агар (pH 5,0) і інкубували при 30 °C протягом 2 діб. Колбу Ерленмеєра об'ємом 250 мл, що містить 100 мл середовища (40 г/л глюкози, 1,7 г/л азотистої основи дріжджів, 2,27 г/л сечовини, 6,56 г/л пептону, 40 г/л ксилози, pH 5,0) інокулювали однією колонією і інкубували протягом 24 годин при 25 °C і 100 об./хв... Після 23 годин росту зразок витягували і вимірювали його оптичну густину (600 нм в ультрафіолетовому спектрофотометрі) і чистоту (барвник Грама). На основі цих результатів одну колбу (так звану колбу для посіву) з оптичною густиною 6,79 і з чистим барвником Грама вибирали для інокуляції всіх досліджуваних колб.

Досліджувані посудини являли собою колби Ерленмеєра об'ємом 250 мл, що містять 100 мл середовища (1,7 г/л азотистої основи дріжджів, 2,27 г/л сечовини, і 6,56 г/л пептону). У колбу із середовищем для росту не додавали цукор (глюкозу або ксилозу). Всі пусті колби витримували в автоклаві при температурі 121 °C і тиску 15 фунтів на кв. дюйм (0,1 МПа) і додавали середовище, стерилізоване на фільтрі з отворами 0,22 мкм, перед додаванням досліджуваних матеріалів. Досліджувані матеріали не стерилізували, тому що обробка в автоклаві змінює вміст зразків, а стерилізація на фільтрі непридатна для стерилізації твердих речовин. Досліджувані зразки (перераховані в таблиці 46) додавали під час інокуляції (а не перед нею), щоб зменшити можливість забруднення. Крім досліджуваних зразків по 1 мл (1 об. %) матеріалу з колби для посіву додавали в кожен колбу. Для колб, що містять зразок P132-100, було потрібне додавання 0,4 мл 1M NaOH, щоб довести значення pH до 5,0. Колби інкубували при 30 °C і 150 об./хв. протягом більше ніж 96 годин.

Один набір приготованих в двох екземплярах колб на кожний вихідний матеріал містив комплексний фермент Accellerase® від фірми Genencor (1,25 мл на колбу, причому найвища рекомендована доза становить 0,25 мл на 1 г біомаси) в спробі одночасного оцукрювання і ферментації (SSF). У іншому наборі приготованих в двох екземплярах колб комплексний фермент Accellerase® не містився. Всього проаналізували 52 колби.

Також аналізували шість контрольних колб. Позитивні контрольні колби містили порошок целюлози SolkaFloc 200 NF (партія № UA158072, виробник International Fiber Corporation) в кількості 2,5 г на колбу об'ємом 100 мл (концентрація 25 г/л) з додаванням і без додавання комплексного ферменту Accellerase®. Крім того, використовували тільки контрольні зразки, що містять цукри (глюкозу і ксилозу).

Таблиця 46

Кількість кожного вихідного матеріалу, доданого в кожную колбу

Номер Xyleco	Додана в колбу кількість
	(г/100 мл)
P132	2.5
P132-10	2.5
P132-100	2.5
A132	5
A132-10	5
A132-100	5
G132	5
G132-10	5
G132-100	5
WS132	5
WS132-10	5
WS132-100	5
Образец А	5

Аналіз

- Зразки аналізували для визначення концентрації етанолу (таблиці 47, 48 і 49), використовуючи біохімічний аналізатор YSI на основі аналізу алкогольдегідрогенази (YSI, Interscience). Зразки центрифугували зі швидкістю 14000 об./хв. протягом 20 хвилин і зберігали надосадову рідину при -20 °С. Перед аналізом зразки розбавляли до концентрації, що становить 0-3,2 г/л етанолу. Стандартний зразок, що містить 2,0 г/л етанолу, аналізували приблизно через кожні 30 зразків, щоб пересвідчитися в збереженні цілісності мембрани в процесі аналізу.

Результати

Таблиця 47

Результати аналізу контрольних колб

Контрольний зразок	Концентрація етанолу (г/л)			
	24 години	36 годин	48 годин	96 годин
Зразок, що містить глюкозу, але не містить целюлози і ферменту	13.20	19.00	20.60	21.60
Зразок, що містить кристалічну целюлозу (SolkaFloc) але не містить цукру і ферменту	0.00	0.00	0.00	0.00
Зразок, що містить кристалічну целюлозу (SolkaFloc) в кількості 25 г/л і добавку Accellerase® 1000, але не містить цукру	6.56	7.88	9.80	8.65

Таблиця 48

Результати аналізу струшуваних колб без комплексного ферменту Accellerase® 1000

Номер зразка	Концентрація етанолу (г/л)			
	24 години	36 годин	48 годин	96 годин
P132	0.09	0.00	0.00	0.12
P132-10	0.02	0.01	0.02	0.17
P132-100	0.09	0.01	0.00	0.02
A132	1.74	1.94	2.59	3.70
A132-10	1.82	2.36	2.30	2.96
A132-100	0.30	0.73	1.31	2.38
G132	0.40	0.09	0.24	0.42
G132-10	0.69	0.42	0.22	0.24
G132-100	0.19	0.05	0.05	0.21
WS132	0.47	0.50	0.68	0.65
WS132-10	0.47	0.49	0.34	0.92
WS132-100	0.14	0.07	0.08	0.22
Зразок А	1.88	1.89	2.30	3.28

Таблиця 49

Результати аналізу струшуваних колб з комплексним ферментом Accellerase® 1000

Номер зразка	Концентрація етанолу (г/л)			
	24 години	36 годин	48 годин	96 годин
P132	7.04	8.72	9.30	5.80
P132-10	4.22	4.48	4.49	1.24
P132-100	3.18	4.28	4.70	3.35
A132	2.79	2.91	2.03	4.30
A132-10	3.31	1.62	2.11	2.71
A132-100	2.06	1.92	1.02	1.47
G132	0.87	0.40	0.32	0.44
G132-10	1.38	1.04	0.63	0.07
G132-100	2.21	2.56	2.34	0.12
WS132	1.59	1.47	1.07	0.99
WS132-10	1.92	1.18	0.73	0.23
WS132-100	2.90	3.69	3.39	0.27
Зразок А	2.21	2.35	3.39	2.98

Приклад 18. Аналіз целюлози

5 Суть експерименту

Тринадцять зразків випробовували на сприйнятливість до целюлази, використовуючи промислову целюлазу Accellerase® 1000 від фірми Genencor при оптимальних умовах температури і pH.

Методика

- 10 Дана методика являє собою модифікацію лабораторної аналітичної процедури NREL LAP-009 "ферментативне оцукрювання лігноцелюлозної біомаси". Зразок матеріалу додавали в 10 мл буферного розчину 0,1 М цитрату натрію (pH 4,8) і 40 мг/мл тетрацикліну (для запобігання росту бактерій) в пробірці об'ємом 50 мл в двох екземплярах. Кількість зразка, доданого в кожен пробір, вказана в таблиці 50. Деякі зразки було важко змішувати (P132, P132-10, P132-100),
- 15 тому їх додавали в меншій концентрації. Також готували позитивний контрольний розчин, що містить 0,2 г порошкоподібної целюлози SolkaFloc 200 NF (партія № UA158072, виробник International Fiber Corporation), і негативний контрольний розчин (без зразка). У пробірки додавали достатню кількість очищеної зворотним осмосом (RO) води, щоб довести повний

об'єм до 20 мл. Перед використанням буферний розчин цитрату натрію і воду нагрівали до 50 °C.

- 5 Фермент Accellerase® 1000 додавали в кожну пробірку в кількості 0,25 мл на 1 грам біомаси (максимальне дозування, рекомендоване фірмою Genescor). Пробірки інкубували під кутом 45° при швидкості обертання 150 об./хв. і температурі 50 °C (умови рекомендовані фірмою Genescor) протягом 72 годин. Зразки витягували через 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48 і 72 години (таблиці 52 і 53), центрифугували зі швидкістю 14000 об./хв. протягом 20 хвилин і надосадову рідину заморожували при -20 °C. Концентрацію глюкози в зразках аналізували за допомогою біохімічного аналізатора YSI (Interscience), використовуючи умови, описані в таблиці 51.
- 10 Стандартний розчин глюкози з концентрацією 2,5 г/л готували розчиненням 2,500 г глюкози (виробник Sigma, номер по каталогу G7528-5KG, номер партії 107H0245) в дистильованій воді. Після розчинення повний об'єм доводили дистильованою водою до 1 л в мірній колбі. Свіжий стандартний розчин готували щотижня і зберігали при 4 °C.

Таблиця 50

Додана кількість кожного зразка

Номер Xyleco	Додана у пробірку кількість (г/100мл)
P132	0.5
P132-10	0.5
P132-100	0.5
A132	0.75
A132-10	0.75
A132-100	0.75
G132	0.75
G132-10	0.75
G132-100	0.75
WS132	0.75
WS132-10	0.75
WS132-100	0.75
Зразок А	0.75
SolkaFloc 200NF (контроль)	0.2
Негативний контроль	0

Таблиця 51

Компоненти YSI, використані в дослідженні із струшуванням колби

Компонент	Номер по каталогу	Номер партії
Глюкозна мембрана YSI	2365	07D100124
Глюкозний буфер YSI	2357	014614A

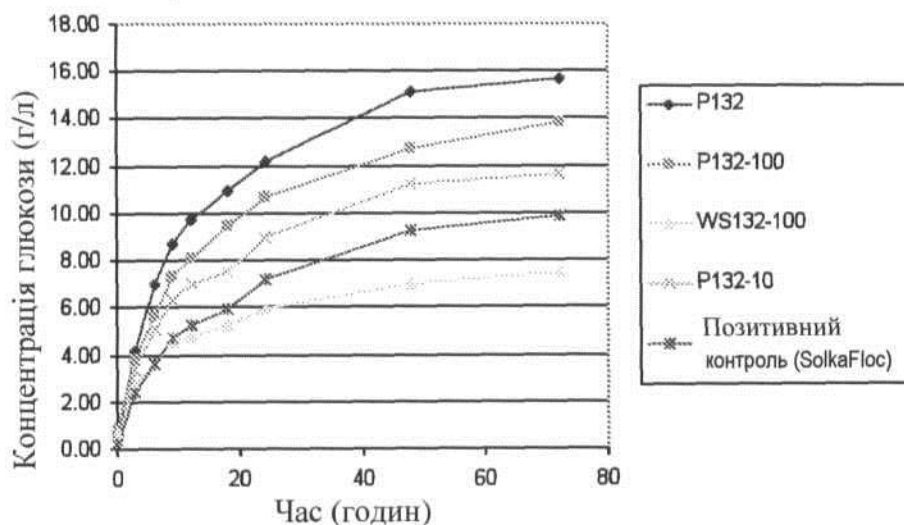
Результати

Таблиця 52

Результати аналізу целюлози

Номер зразка	Концентрація глюкози (мг/мл) при часі інкубації (годин)								
	0	3	6	9	12	18	24	48	72
P132	0.59	4.19	7.00	8.72	9.70	10.95	12.19	15.10	15.65
P132-10	0.36	3.37	5.08	6.39	6.98	7.51	8.99	11.25	11.65
P132-100	0.91	3.86	5.67	7.31	8.08	9.47	10.70	12.70	13.80
A132	0.39	1.51	1.92	2.40	2.64	3.04	3.30	3.90	4.06
A132-10	0.42	1.80	2.27	2.63	2.86	3.16	3.43	4.02	4.14
A132-100	0.46	2.09	2.72	3.16	3.43	3.78	4.09	4.84	5.26
G132	0.40	1.16	1.35	1.52	1.60	1.67	1.85	2.10	2.21
G132-10	0.34	1.34	1.64	1.95	2.03	2.09	2.36	2.77	3.02
G132-100	0.61	1.84	2.32	2.89	3.14	3.52	3.97	4.81	5.44
WS132	0.35	1.48	1.81	2.14	2.26	2.50	2.70	3.18	3.26
WS132-10	0.44	1.77	2.22	2.60	2.76	2.61	3.15	3.62	3.82
WS132-100	0.70	2.76	3.63	4.59	4.78	5.29	5.96	6.99	7.43
Зразок А	0.42	1.09	1.34	1.55	1.69	1.66	2.17	2.96	3.71
Негативний контроль (без зразка)	0.03	0.03	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02
Позитивний контроль (Solka-luc)	0.17	2.38	3.65	4.71	5.25	5.98	7.19	9.26	9.86

Графік 1. Концентрація глюкози (чотири кращих виробники)



Кількість целюлози, переробленої в пробірці, обчислювали таким чином

Концентрація глюкози (г/мл) × 20 мл (об'єм зразка) × 0,9 (поправка на молекулу води, доданої при гідролізі целюлози)

5 Процентну частку всього зразка, переробленого в глюкозу (див. приведену нижче таблицю 53) обчислювали таким чином:

Маса переробленої целюлози (г)/маса доданого зразка (г) (див. подробиці в таблиці 5) × 100

Таблиця 53

Результати аналізу целюлози

Номер зразка	Перероблена в глюкозу частка повної маси зразка (%) при часі інкубації (год)								
	0	3	6	9	12	18	24	48	72
P132	2.02	14.98	25.16	31.36	34.85	39.38	43.81	54.29	56.27
P132-10	1.19	12.02	18.25	22.97	25.06	27.00	32.29	40.43	41.87
P132-100	3.17	13.79	20.38	26.28	29.02	34.06	38.45	45.65	49.61
A132	0.86	3.55	4.58	5.74	6.29	7.27	7.87	9.31	9.70
A132-10	0.94	4.25	5.42	6.29	6.82	7.56	8.18	9.60	9.89
A132-100	1.03	4.94	6.50	7.56	8.18	9.05	9.77	11.57	12.58
G132	0.89	2.71	3.22	3.62	3.79	3.98	4.39	4.99	5.26
G132-10	0.74	3.14	3.91	4.66	4.82	4.99	5.62	6.60	7.20
G132-100	1.39	4.34	5.54	6.91	7.49	8.42	9.48	11.50	13.01
WS132	0.77	3.48	4.32	5.11	5.38	5.98	6.43	7.58	7.78
WS132-10	0.98	4.18	5.30	6.22	6.58	6.24	7.51	8.64	9.12
WS132-100	1.61	6.55	8.69	10.99	11.42	12.67	14.26	16.73	17.78
Зразок А	0.94	2.54	3.19	3.70	4.01	3.96	5.16	7.06	8.86
Позитивний контроль (SolkaFloc)	1.29	21.15	32.72	42.30	47.07	53.73	64.53	83.16	88.56

Приклад 19. Ферментація у струшуваній колбі при використанні *Pichia stipitis*

Суть експерименту

5 Ферментацію у струшуваній колбі при використанні *Pichia stipitis* здійснювали з використанням чотирьох целюлозних матеріалів, що мають найвищу процентну ефективність, згідно з таблицею 36.

Методика

Експерименти проводили при параметрах, приведених в таблицях 54-56.

Таблиця 54

Обладнання і періодичність обслуговування

Обладнання	Виробник і модель	Періодичність обслуговування
Струшувач (2)	B. Braun Biotech, Certomat BS-1	Щоквартальне
Спектрофотометр	Unicam, UV300	Піврічне
Біохімічний аналізатор YSI	Interscience, YSI	Щомісячне

Таблиця 55

Компоненти YSI, використовувані в дослідженнях із струшуванням колби

Компонент	Номер по каталогу	Номер партії
Мембрана для етанолу YSI	2786	07M100361
Стандартний розчин етанолу SI (3,2 г/л)	2790	1271040
Буферний розчин в етанолі SI	2787	07J100215

10

Таблиця 56

Хімічні речовини, використовувані для ферментації у струшуваній колбі

Компонент середовища	Виробник	Реєстраційний номер	Номер партії
Сечовина	ScholAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Азотиста основа дріжджів	Becton Dickinson	291940	7128171
Пептон	Becton Dickinson	211677	4303198
Солодово-дріжджовий бульйон	Becton Dickinson	271120	6278265
Ксилоза	Alfa Aesar	A10643	10130919
Глюкоза	Fisher Scientific	BP350-1	030064

Розвиток посіяної культури

Для всіх наступних експериментів зі струшуванням колби для посіву готували згідно з наступною методикою.

15

Робочий запас клітин *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 готували з регідратованої ліофілізованої культури, отриманої з колекції культур ARS. Кріоампули, що містять культуру *Pichia stipitis* в розчині, який містить 15 об. % гліцерину, зберігали при -75 °С. Порцію відталого матеріалу з робочого запасу клітин висівали штрихом на солодово-дріжджовий (YM) бульйон+20 г/л агар (рН 5,0) і інкубували при 30 °С протягом 2 діб. Перед використанням чашки витримували протягом 2 діб при 4 °С. Колбу Ерленмеєра об'ємом 250 мл, що містить 100 мл середовища (40 г/л глюкози, 1,7 г/л азотистої основи дріжджів, 2,27 г/л сечовини, 6,56 г/л пептону, 40 г/л ксилози, рН 5,0) інокулювали однією колонією і інкубували протягом 24 годин при 25 °С і 100 об./хв... Після 23 годин росту зразок витягували і вимірювали його оптичну густину (600 нм в ультрафіолетовому спектрофотометрі) і чистоту (барвник Грама). На основі цих результатів

20

одну колбу (так звану колбу для посіву) з оптичною густиною між 4 і 8 і з чистим барвником Грама використовували для інокуляції всіх досліджуваних колб.

Проводили три експерименти, використовуючи зразки A132-10, A132-100, G132-10 і G132-100. У експерименті № 1 в цих чотирьох зразках досліджували концентрацію етанолу при змінній концентрації ксилози і при постійній концентрації глюкози. У експерименті № 2 в цих чотирьох зразках досліджували концентрацію етанолу при подвійній концентрації вихідного матеріалу, використаного в експериментах згідно з таблицею 36. Нарешті, в експерименті № 3 в цих чотирьох зразках досліджували концентрацію етанолу при одночасній зміні концентрацій ксилози і глюкози.

Експеримент № 1. Зміна концентрації ксилози

Чотири зразки целюлози (A132-10, A132-100, G132-10 і G132-100) випробовували при змінній концентрації ксилози, як показано в приведеній нижче таблиці 57.

Таблиця 57

Склад середовища в колбах експерименту № 1

Обробка	Концентрація ксилози (г/л)	Концентрація глюкози (г/л)
100 % Ксилоза	40.0	40.0
50 % Ксилоза	20.0	40.0
25 % Ксилоза	10.0	40.0
10 % Ксилоза	4.0	40.0
0 % Ксилоза	0.0	40.0

Досліджувана посудина (всього 40 колб Ерленмеєра об'ємом по 250 мл), містили по 100 мл середовища. Готували середовище п'яти різних типів, використовуючи кількості ксилози і глюкози, приведені в таблиці 57. Крім того, середовище містило 1,7 г/л азотистої основи дріжджів (№ 291940 від фірми Becton Dickinson), 2,27 г/л сечовини (№ 9472706 від фірми ScholAR Chemistry) і 6,56 г/л пептону (№ 211677 від фірми Becton Dickinson). Всі колби витримували пустими в автоклаві при температурі 121 °C і тиску 15 фунтів на кв. дюйм (0,1 МПа) і стерилізоване на фільтрі (фільтр з отворами 0,22 мкм) середовище помішували в колби перед додаванням досліджуваних матеріалів. Колби витримували при кімнатній температурі протягом 4 діб і перевіряли на забруднення (помутніння) перед використанням. Досліджувані матеріали не стерилізували, тому що обробка в автоклаві змінює вміст зразків, а стерилізація на фільтрі не є достатньою для стерилізації твердих речовин. Досліджувані зразки (A132-10, A132-100, G132-10 і G132-100 в кількості 5 г на 100 мл) додавали під час інокуляції (а не перед нею), щоб зменшити можливість забруднення. Крім досліджуваних зразків в кожену колбу додавали по 1 мл (1 об. %) матеріалу з колби для посіву. Колби інкубували при 30 °C і 150 об./хв. протягом 72 годин.

На жаль, одна колба (зразок A132-100, що містить 100 % ксилози) розбилася під час експерименту. Тому всі результати, отримані після 24 годин інкубації, приведені для однієї колби. Після 72 годин інкубація 100 % вихідної кількості целюлозних матеріалів (5,0 г) додавали в колби, що містять 100 % ксилози (всього 7 колб, тому що розбилася одна колба, яка містить зразок A132-100), і додатково інкубували, як указано вище, протягом 48 годин.

Таблиця 58

Додавання вихідного матеріалу в колби, що містять 100 % ксилози, при інкубації протягом 72 годин

Вихідний матеріал	Додавання при інкубації протягом
A132-10	72 годин (г) 5
A132-100	5
G132-10	5
G132-100	5

Аналіз

Зразки відбирали з 40 досліджуваних колб після інкубації протягом 0, 6, 12, 24, 36, 48 і 72 годин. Крім того, зразки відбирали через 24 і 48 годин після додавання кількості другого вихідного матеріалу, в колби, що містять 100 % ксилози (див. таблицю 58).

Усього в 292 зразках аналізували концентрацію етанолу, використовуючи біохімічний аналізатор YSI на основі аналізу алкогольдегідрогенази (YSI, Interscience).

Зразки центрифугували зі швидкістю 14000 об./хв. протягом 20 хвилин і зберігали надосадову рідину при -20 °С. Потрібно зазначити, що в нульовий момент часу зразки потрібно було фільтрувати через шприц-фільтр з отворами 0,45 мкм. Перед аналізом зразки розбавляли до концентрації етанолу від 0 до 3,2 г/л. Стандартний розчин, що містить 2,0 г/л етанолу, аналізували приблизно через кожні 30 зразків, щоб пересвідчитися в збереженні цілісності мембрани.

Всього 47 зразків аналізували підрахунком клітин. Зразки відбирали після 72 годин інкубації і через 48 годин після додавання додаткового целюлозного матеріалу. Відповідним чином розбавлені зразки змішували з 0,05 % трипанового синього і завантажували в гемоцитометр Нойбауера (Neubauer). Клітини вважали при 40-кратному збільшенні.

Експеримент № 2. Аналіз при подвійній концентрації вихідного матеріалу

Досліджувані посудини (всього 8 колб Ерленмєєра об'ємом по 250 мл) містили по 100 мл середовища. Середовище містило 40 г/л глюкози, 40 г/л ксилози, 1,7 г/л азотистої основи дріжджів (№ 291940 від фірми Becton Dickinson), 2,27 г/л сечовини (№ 9472706 від фірми ScholAR Chemistry) і 6,56 г/л пептону (№ 211677 від фірми Becton Dickinson). Колби готували таким же чином, як в експерименті № 1. Досліджувані зразки (A 132-10, A132-100, G132-10 і G132-100 в кількості 10 г на 100 мл) додавали під час інокуляції (а не перед нею), щоб зменшити можливість забруднення. Крім досліджуваних зразків в кожену колбу додавали по 1 мл (1 об. %) матеріалу з колби для посіву. Колби інкубували при 30 °С і 150 об./хв. протягом 72 годин.

Аналіз

Зразки відбирали з 8 досліджуваних колб після інкубації протягом 0, 6, 12, 24, 36, 48 і 72 годин. Результати аналізу на вміст етанолу в 56 зразках, проведеного згідно з експериментом № 1, приведені в таблиці 59. Кількість клітин, визначена для зразка, інкубованого протягом 72 годин, згідно з експериментом № 1, приведена в таблиці 60.

Таблиця 59

Концентрація етанолу в колбах з подвійною кількість вихідного матеріалу

Час інкубації зразка (годин)	Концентрація етанолу (г/л)			
	A132-10	A132-100	G132-10	G132-100
0	1.38	0.26	0.12	0.11
6	1.75	0.21	0.20	0.10
12	2.16	0.73	0.69	0.31
24	19.05	15.35	16.55	12.60
36	21.75	17.55	18.00	15.30
48	26.35	23.95	24.65	20.65
72	26.95	27.35	28.90	27.40

Таблиця 60

Концентрація клітин після інкубації протягом 72 годин в колбах з подвійною кількістю вихідного матеріалу	
Зразок	Концентрація клітин г(10 ⁸ /мл)
A132-10	4.06
A132-100	5.37
G132-10	5.18
G132-100	4.47

Експеримент № 3. Зміна концентрацій ксилози і глюкози Чотири зразки целюлози (A132-10, A132-100, G132-10 і G132-100) випробовували при зміні концентрацій ксилози і глюкози, як показано в приведеній нижче таблиці (таблиця 61).

Таблиця 61

Склад середовища в колбах експерименту №3

Обробка	Концентрація ксилози (г/л)	Концентрація глюкози (г/л)
50 % Цукор	20.0	20.0
25 % Цукор	10.0	10.0
10 % Цукор	4.0	4.0
0 % Цукор	0.0	0

Досліджувані посудини (всього 32 колби Ерленмєєра об'ємом по 250 мл), що містили по 100 мл середовища. Готували середовище чотирьох різних типів з кількостями ксилози і глюкози, приведеними в таблиці 61. Крім того, середовище містило 1,7 г/л азотистої основи дріжджів (№ 291940 від фірми Becton Dickinson), 2,27 г/л сечовини (№ 9472706 від фірми ScholAR Chemistry) і 6,56 г/л пептону (№ 211677 від фірми Becton Dickinson). Колби готували згідно з експериментом № 1. Досліджувані зразки (A132-10, A132-100, G132-10 і G132-100) додавали під час інокуляції (а не перед нею), щоб зменшити можливість забруднення. Крім досліджуваних зразків в кожну колбу додавали по 1 мл (1 об. %) матеріалу з колби для посіву. Колби інкубували при 30 °C і 150 об./хв. протягом 72 годин.

Аналіз

Зразки відбирали з 32 досліджуваних колб після інкубації протягом 0, 6, 12, 24, 36, 48 і 72 годин (див. таблиці 62-65). Усього в 224 зразках аналізували концентрацію етанолу, використовуючи біохімічний аналізатор YSI на основі аналізу алкогольдегідрогенази (YSI, Interscience). Зразки центрифугували зі швидкістю 14000 об./хв. протягом 20 хвилин і зберігали надосадову рідину при -20 °C. Потрібно зазначити, що для деяких зразків потрібно було центрифугування і подальше фільтрування через шприц-фільтр з отворами 0,45 мкм. Перед аналізом зразки розбавляли до концентрації, що становить 0-3,2 г/л етанолу. Стандартний розчин, що містить 2,0 г/л етанолу, аналізували приблизно через кожні 30 зразків, щоб пересвідчитися в збереженні цілісності мембрани YSI.

Таблиця 62

Результати аналізу етанолу в зразку A132-10

Час інкубації зразка (годин)	Концентрація етанолу								
	0 % Ксилоза	10 % Ксилоза	25 % Ксилоза	50 % Ксилоза	100 % Ксилоза	0 % Цукру*	10 % Цукру*	25 % Цукру*	50 % Цукру*
0	0.43	0.42	0.42	0.41	0.39	0.53	0.57	0.56	0.56
6	1.16	1.16	1.15	1.16	1.12	0.93	0.91	0.83	0.88
12	1.72	1.86	1.71	1.79	1.90	1.21	2.13	2.47	2.32
24	15.55	15.90	17.05	17.05	16.95	1.02	4.88	9.77	13.35
36	17.10	17.40	20.25	21.35	20.25	1.29	4.27	9.99	17.55
48	16.40	17.05	19.70	23.00	26.80	1.47	3.03	8.33	16.60
72	15.15	15.55	19.25	21.85	28.00	1.14	1.52	5.08	14.20
24 години після додавання	-	-	-	-	23.15	-	-	-	-
48 годин після додавання	-	-	-	-	21.55	-	-	-	-

*Аналіз експерименту № 3

Таблиця 63

Результати аналізу етанолу в зразку A132-100

Час інкубації зразка (годин)	Концентрація етанолу (г/л)								
	0 % Ксилоза	10 % Ксилоза	25 % Ксилоза	50 % Ксилоза	100 % Ксилоза	0 % Цукру*	10 % Цукру*	25 % Цукру*	50 % Цукру*
0	0.11	0.09	0.17	0.20	0.18	0.12	0.14	0.09	0.13
6	0.13	0.15	0.15	0.15	0.14	0.10	0.11	0.11	0.13
12	0.88	1.00	1.18	1.25	0.89	0.18	1.58	1.55	1.57
24	15.90	15.70	16.50	16.05	14.60**	0.18	3.33	7.99	11.15
36	16.00	17.90	16.90	19.45	17.80**	0.21	2.85	8.37	16.10
48	15.75	16.70	19.30	22.15	27.00**	0.54	1.47	7.54	15.60
72	14.85	15.35	18.55	21.30	28.50**	0.78	0.51	4.47	12.90
24									

*Аналіз експерименту № 3

**Всі результати на основі аналізу однієї колби

Таблиця 64

Результати аналізу етанолу в зразку G132-10

Час інкубації і зразка (годин)	Концентрація етанолу (г/л)								
	0 % Ксилоза	10 % Ксилоза	25 % Ксилоза	50 % Ксилоза	100 % Ксилоза	0 % Цукру*	10 % Цукру*	25 % Цукру*	50 % Цукру*
0	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.05	0.05	0.05	0.06
6	0.14	0.13	0.14	0.14	0.13	0.11	0.12	0.11	0.12
12	1.01	0.96	1.00	0.87	1.14	0.48	1.60	1.79	1.71
24	15.90	15.70	16.30	16.05	14.60	0.13	3.96	8.54	11.10
36	15.10	17.45	16.80	18.75	22.15	0.09	3.02	8.69	16.55
48	15.95	16.90	19.25	21.10	24.00	0.07	2.05	8.10	16.50
72	13.50	15.80	18.55	21.25	26.55	0.09	0.11	5.55	14.15
24 години після додавання	-	-	-	-	24.95	-	-	-	-
48 годин після додавання	-	-	-	-	24.20	-	-	-	-

* Аналіз експерименту № 3

Таблиця 65

Результати аналізу етанолу в зразку G132-100

Час інкубації зразка (годин)	Концентрація етанолу								
	0 % Ксилоза	10 % Ксилоза (мас/об. %)	25 % Ксилоза (мас/об. %)	50 % Ксилоза (мас./об. %)	100 % Ксилоза (мас/об. %)	0 % Цукру*	10 % Цукру*	25 % Цукру*	50 % Цукру*
0	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
6	0.07	0.07	0.08	0.08	0.07	0.04	0.05	0.05	0.06
12	0.60	0.56	0.67	0.58	0.71	0.13	1.37	1.48	1.44
24	13.05	14.45	14.90	13.95	12.05	0.03	3.67	7.62	10.55
36	15.10	17.10	18.25	18.20	19.25	0.01	3.09	8.73	16.10

Продовження таблиці 65

48	14.40	17.00	19.35	22.55	24.45	0.01	1.91	7.76	15.85
72	14.70	15.40	18.45	22.10	27.55	0.03	0.01	5.08	14.30
24 години після додавання	-	-	-	-	25.20	-	--	-	-
48 годин після додавання	-	-	-	-	24.60	-	--	-	--

* Аналіз експерименту № 3

Зразки відбирали після інкубації протягом 72 годин для підрахунку клітин (див. таблиці 66-67). Відповідним чином розбавлені зразки змішували з 0,05 % трипанового синього і завантажували в гемоцитометр Нойбауера (Neubauer). Клітини вважали при 40-кратному збільшенні.

Результати

Одну колбу для посіву використовували для інокуляції всіх досліджуваних колб в експериментах № 1 і № 2. Виміряна оптична густина (600 нм) в колбі для посіву становила 5,14, і концентрація клітин становила $4,65 \times 10^6$ клітин/мл (таблиці 65-66). Отже, первинна концентрація клітин в досліджуваних колбах становила приблизно $4,65 \times 10^6$ клітин/мл.

Другу колбу для посіву використовували для інокуляції колб експерименту № 3. Виміряна оптична густина (600 нм) в колбі для посіву становила 5,78, і концентрація клітин становила $3,75 \times 10^8$ клітин/мл. Отже, первинна концентрація клітин в досліджуваних колбах становила приблизно $3,75 \times 10^6$ клітин/мл.

Таблиця 66

Концентрація клітин після інкубації протягом 72 годин

Зразок	Концентрація клітин 10 ⁸ /мл)								
	0 % Ксилоза	10 % Ксилоза	25 % Ксилоза	50 % Ксилоза	100 % Ксилоза	0 % Цукор	10 % Цукор	25 % Цукор	50 % Цукор
A132-10	0.37	0.63	3.72	4.92	4.05	0.26	0.22	0.26	1.54
A132-100	0.99	1.07	0.99	0.78	1.97	0.03*	0.33	0.44	1.81
G132-10	0.95	4.50	2.67	2.67	3.82	0.01*	0.17	0.49	1.92
G132-100	6.53	4.02	4.84	4.47	5.29	0.01*	0.33	0.89	2.22

*Зразки були сильно забруднені після 72 годин росту. Це очікувалося, тому що культура *Pichia* не показувала хорошого росту без додавання цукру, і домішки (із нестерильних зразків) могли перевершити в рості культуру *Pichia*

Таблиця 67

Концентрація клітин при інкубації протягом 48 годин після додавання 100 % ксилоли і глюкози

Зразок	Концентрація клітин (10^8 /мл)
A132-10	10.17
A132-100	3.38
G132-10	3.94
G132-100	6.53

Приклад 20. Випробування токсичності лігноцелюлозних зразків відносно *Pichia stipitis* і *Saccharomyces cerevisiae*

Суть експерименту

Тридцять сім зразків аналізували на токсичність відносно двох виробляючих етанол культур, а саме *Saccharomyces cerevisiae* і *Pichia stipitis*. У цьому дослідженні в зразки додавали

глюкозу, щоб розрізнити вирощування культур на мінімальному середовищі і токсичність зразків.

Таблиця 68

Умови випробування на токсичність

Параметр	Організм	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 24858	<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124
Об'єм інокуляції (мл)	0.5-1 (ціль $6-7 \times 10^5$ клітин/мл)	1 (ціль $3-4 \times 10^6$ клітин/мл)
Повторення випробування	Колби в одному екземплярі	
Температура інкубації ($\pm 1^\circ\text{C}$)	25 °C	25 °C
Швидкість струшувача (об/хв)...	200	125
Тип контейнера	500 мл Колба Ерленмєєра	250 мл Колба Ерленмєєра
Об'єм середовища	100 мл	100 мл
Повний час інкубації (годин)	72	72
Час аналізу етанолу (годин)	0, 6, 12, 24, 36, 48, 72	0, 6, 12, 24, 36, 48, 72
Час підрахунку клітин (годин)	24, 72	24, 72
pH	0 годин	0 годин

5 Методика

Суть використаної методики приведена в таблиці 68. Опис хімічних речовин, використаних у випробуванні токсичності, приведені в таблиці 69. По дві контрольні колби (без додавання зразка) готували для кожного мікроорганізму на кожний тиждень випробування. Всього проаналізували 82 колби.

- 10 Протягом експериментів не було виявлено етанолу і клітин в колбах, що містять культуру *Pichia stipitis*, із зразками C, C-1e, C-5e і C-10e протягом перших 24 годин інкубації. Для підтвердження результатів випробування повторювали. Друге випробування підтвердило деяке інгібування росту культури *Pichia stipitis* при додаванні в колби зразків C, C-1e, C-5e і C-10e.

Таблиця 69

Хімічні речовини і матеріали, використані у випробуванні токсичності

Компонент середовища	Виробник	Реєстраційний номер	Номер партії
Сечовина	ScholAR Chemistry	9472706	AD-7284-43
Азотиста основа дріжджів	Becton Dickinson	291940	7128171
Пептон	Becton Dickinson	211677	4303198
Ксилоза	Alfa Aesar	A10643	10130919
Глюкоза	Sigma	G-5400	107H0245
Екстракт дріжджів		288620	4026828
Солодово-дріжджовий бульйон	Becton Dickinson	271120	6278265

Компоненти YSI, використані у випробуванні токсичності

Компонент	Номер по каталогу
Мембрана для етанолу YSI	2786
Стандартний розчин етанолу YSI (3,2 г/л)	2790
Буферний розчин в етанолі YSI	2787

Досліджувані зразки

Сім досліджуваних зразків (всі мають позначення С) подрібнювали за допомогою кавомолки, прийнятної для малих зразків. Зразки подрібнювали до такої міри, щоб можна було розрізнити розміри частинок (при порівнянні зразків) неозброєним оком. Зразок номер С-100е легко подрібнювали для отримання частинок дрібного розміру.

Всі зразки додавали в колби в кількості 50 г на літр, за винятком шести зразків, позначених Р (25 г на літр). Ці зразки були від білого до кремового кольору і крихкими на вигляд, і вміст колб неможливо був перемішувати належним чином (внаслідок недостатності вільної рідини) при концентрації 50 г/л. Зразки S легко розчинялися, і їх можна було, потім додавати в колби в вищій концентрації. Зразки А і G можна було, потім додавати в кількості 100 г/л.

Випробування здійснювали з використанням двох мікроорганізмів, як описано нижче.

Saccharomyces cerevisiae ATCC 24858 (з колекції типових культур США)

Робочий запас клітин культури *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858 готували з регідратованої ліофілізованої культури, отриманої з колекції типових культур США. Кріоампули, що містять культуру *Saccharomyces cerevisiae* в розчині 15 об. % гліцерину, зберігали при -75 °С. Порцію відталого матеріалу з робочого запасу клітин висівали штрихом на солодово-дріжджовий бульйон (YM)+20 г/л агар (рН 5,0) і інкубували при 30 °С протягом 2 діб. Колбу Ерленмеєра об'ємом 250 мл, що містить 50 мл середовища (20 г/л глюкози, 3 г/л екстракту дріжджів і 5,0 г/л пептону, рН 5,0), інокулювали однією колонією з чашки з солодово-дріжджовим бульйоном (YM) і інкубували протягом 24 годин при 25 °С і 200 об./хв... Після 23 годин росту зразок витягували і вимірювали його оптичну густину (600 нм в ультрафіолетовому спектрофотометрі) і чистоту (барвник Грама). На основі цих результатів одну колбу (так звану колбу для посіву) з OD=9-15 і чистим барвником Грама використовували, щоб інокулювати колби для росту. Після 23 годин росту вміст колби для посіву мав низьке значення оптичної густини (5,14) і кількість клітин ($1,35 \times 10^8$ клітин/мл). Потрібно зазначити, що колонія, взята з чашки для посіву, була менша звичайної. Отже, в кожную досліджувану посудину додавали по 0,5 мл посівного матеріалу (замість планової кількості, що становила 0,1 мл).

Досліджувані посудини являли собою колби Ерленмеєра об'ємом 500 мл, що містять 100 мл стерильного середовища, описаного вище. Всі колби витримували в автоклаві при температурі 12ГС і тиску 15 фунтів на кв. дюйм (0,1 МПа) перед додаванням досліджуваних матеріалів. Досліджувані матеріали не стерилізували, оскільки обробка в автоклаві приводить до зміни зразків. Досліджувані зразки додавали під час інокуляції (а не перед нею), щоб зменшити можливість забруднення. Крім досліджуваних зразків в кожную колбу додавали по 0,5-1,0 мл (0,5-1,0 об. %) матеріалу з колби для посіву. Колби інкубували, як описано вище, протягом 72 годин.

Pichia stipitis з колекції культур ARS

Робочий запас клітин культури *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 готували з регідратованої ліофілізованої культури, отриманої з колекції культур ARS. Кріоампули, що містять культуру *Pichia stipitis* в розчині 15 об. % гліцерину, зберігали при -75 °С. Порцію відталого матеріалу з робочого запасу клітин висівали штрихом на солодово-дріжджовий бульйон (YM)+20 г/л агар (рН 5,0) і інкубували при 30 °С протягом 2 діб. Перед використанням чашки витримували до 5 діб при 4 °С. Колбу Ерленмеєра об'ємом 250 мл, що містить 100 мл середовища (40 г/л глюкози, 1,7 г/л азотистої основи дріжджів, 2,27 г/л сечовини, 6,56 г/л пептону, 40 г/л ксилози, рН 5,0), інокулювали однією колонією і інкубували протягом 24 годин при 25 °С і 125 об./хв... Після 23 годин росту зразок витягували і вимірювали його оптичну густину (600 нм в ультрафіолетовому спектрофотометрі) і чистоту (барвник Грама). На основі цих результатів одну колбу (так звану колбу для посіву) з оптичною густиною 5-9 і чистим барвником Грама використовували для інокуляції всіх досліджуваних колб.

Досліджувані посудини являли собою колби Ерленмеєра об'ємом 250, що містять по 100 мл стерильного середовища, описаного вище. Всі колби витримували пустими в автоклаві при

температурі 121 °C і тиску 15 фунтів на кв. дюйм (0,1 МПа), і стерилізоване на фільтрі (фільтр з отворами 0,22 мкм) середовище помішували в колби перед додаванням досліджуваних матеріалів. Досліджувані матеріали не стерилізували, тому що обробка в автоклаві змінює вміст зразків, а стерилізація на фільтрі не є достатньою для стерилізації твердих речовин.

5 Досліджувані зразки додавали під час інокуляції (а не перед нею), щоб зменшити можливість забруднення. Крім досліджуваних зразків в кожну колбу додавали по 1 мл (1 об. %) матеріалу з колби для посіву. Колби інкубували, як описано вище, протягом 72 годин.

Аналіз

10 Зразки витягували з колб для посіву безпосередньо перед інокуляцією і з кожної досліджуваної колби через 24 і 72 години і аналізували концентрацію клітин, використовуючи прямий підрахунок. Відповідним чином розбавлені зразки культур *Saccharomyces cerevisiae* і *Pichia stipitis* змішували з 0,05 % трипанового синього і завантажували в гемоцитометр Нойбауера (Neubauer). Клітини рахували при 40-кратному збільшенні.

15 Зразки витягували з кожної колби через 0, 6, 12, 24, 36, 48 і 72 години і аналізували концентрацію етанолу, використовуючи біохімічний аналізатор YSI на основі аналізу алкогольдегідрогенази (YSI, Interscience). Зразки центрифугували зі швидкістю 14000 об./хв. протягом 20 хвилин і зберігали надосадову рідину при -20 °C. Перед аналізом зразки розбавляли до вмісту етанолу, що становить 0-3,2 г/л. Стандартний розчин, що містить 2,0 г/л етанолу, аналізували приблизно через кожні 30 зразків, щоб пересвідчитися в збереженні цілісності мембрани в процесі аналізу.

20

Обчислення

Наступні обчислення використовували для порівняння кількості клітин і концентрації етанолу з контрольними колбами.

25 Процентна ефективність = (концентрацій етанолу в досліджуваній колбі/концентрація етанолу в контрольній колбі)×100

Процентна кількість клітин = (Кількість клітин в досліджуваній колбі/кількість клітин в контрольній колбі)×100

Результати

30 У колбі для посіву культури *Saccharomyces cerevisiae* оптична густина (600 нм) становила 5,14, і концентрація клітин становила $1,35 \times 10^8$ клітин/мл. По 0,5 мл матеріалу з колби для посіву додавали в кожну з досліджуваних колб. Отже, вихідна концентрація клітин в кожній колбі становила $6,75 \times 10^5$ клітин/мл. Під час другого тижня випробування в колбі для посіву культури *Saccharomyces cerevisiae* оптична густина (600 нм) становила 4,87, і концентрація клітин становила $3,15 \times 10^7$ клітин/мл. По 1 мл матеріалу з колби для посіву додавали в кожну з досліджуваних колб. Отже, вихідна концентрація клітин в кожній колбі становила $6,30 \times 10^7$ клітин/мл. Значення pH вмісту колби з культурою *Saccharomyces cerevisiae* при відборі зразка в нульовий момент часу приведені в таблиці 71. Значення pH вмісту колби знаходилося в оптимальному інтервалі для росту культури *Saccharomyces cerevisiae* (pH 4-6). Регулювання pH не було потрібне.

40

Таблиця 71

Значення pH вмісту колби з культурою *Saccharomyces cerevisiae* при відборі зразка в нульовий момент часу

Номер зразка	pH	Номер зразка	pH
P	5.04	C	5.46
P1E	4.99	C1E	5.54
P5E	5.04	C5E	5.50
P10E	4.98	C10E	5.33
P50E	4.67	C30E	5.12
P100E	4.43	C50E	4.90
G	5.45	C100E	4.66
G1E	5.47	ST	5.11
G5E	5.46	ST1E	5.06
G10E	5.39	ST5E	4.96
G50E	5.07	ST10E	4.94
A	5.72	ST30E	5.68
A1E	5.69	ST50E	4.48
A5E	5.62	ST100E	4.23
A10E	5.61	контроль А	5.02
A50E	5.74	контроль В	5.04
S*	5.10		
S1E	5.08		
S5E	5.07		
S10E	5.04		
S30E	4.84		
S50E	4.57		
S100E	4.33		

*S означає сахарозу

*C означає кукурудзу

*ST означає крохмаль

Значення концентрації етанолу і ефективності культури в колбах з *Saccharomyces cerevisiae* представлені в таблиці 72 і 73. Найвищі концентрації етанолу отримані в зразках серії S.

Таблиця 72

Концентрація етанолу в колбах з культурою *Saccharomyces cerevisiae*

Номер зразка	Концентрація етанолу (г/л) в наступні моменти часу (годин)						
	0	6	12	24	36	48	72
P	0.02	0.04	0.38	5.87	7.86	5.41	1.04
P1E	0.03	0.03	0.28	5.10	8.03	5.46	0.58
P5E	0.03	0.04	0.57	8.84	6.38	3.40	0.04
P10E	0.06	0.05	0.65	6.63	7.66	5.57	1.40
P50E	0.04	0.03	0.26	2.80	5.85	8.59	5.68
P100E	0.04	0.02	0.12	3.64	8.26	7.51	3.03
G	0.04	0.04	0.57	10.20	8.24	6.66	2.84
G1E	0.04	0.05	0.46	10.20	9.24	6.94	2.84
G5E	0.11	0.11	0.44	10.00	8.7	6.36	0.88
G10E	0.05	0.04	0.40	9.97	8.41	5.79	0.11
G50E	0.05	0.05	0.48	9.72	8.33	6.13	2.38
A	0.29	0.38	0.48	8.43	8.76	7.09	4.66
A1E	0.34	0.44	0.79	9.66	8.9	7.18	2.64
A5E	0.55	0.45	0.99	9.44	8.96	7.56	3.80
A10E	0.55	0.55	0.93	9.58	8.33	6.28	1.40
A50E	0.22	0.08	0.38	9.38	8.01	5.99	0.98
S	0.03	0.03	0.39	5.73	7.06	10.10	15.90
S1E	0.05	0.06	0.31	7.24	9.52	12.10	14.90
S5E	0.02	0.05	0.34	5.87	7.68	11.90	19.00
S10E	0.03	0.04	0.35	5.88	7.72	11.50	19.30
S30E	0.03	0.05	0.09	5.94	7.97	11.20	20.40
S50E*	0.13	0.19	0.47	5.46	7.96	13.00	18.30
S100E	0.11	0.10	0.21	7.00	10.6	13.80	12.70
C	0.01	0.04	0.32	8.47	7.57	5.48	6.40
C1E	0.00	0.06	0.37	8.93	7.86	5.99	1.37
C5E	0.03	0.05	0.48	9.32	7.92	5.69	1.41
C10E	0.02	0.04	0.52	9.14	7.67	5.34	0.35
C30E	0.02	0.05	0.28	9.15	8.15	5.84	2.47
C50E	0.03	0.06	0.44	9.31	7.79	5.78	1.79
C100E	0.03	0.06	0.58	9.06	6.85	5.95	1.09
ST	0.02	0.05	0.99	8.54	6.69	5.09	0.42
ST1E	0.03	0.04	0.70	8.87	7.29	4.81	1.04
ST5E	0.02	0.04	0.52	8.61	7.16	4.97	0.85
ST10E	0.02	0.05	0.33	8.97	7.05	5.26	0.68
ST30E	0.03	0.04	0.71	8.47	6.96	4.89	0.21
ST50E	0.04	0.07	0.34	8.46	8.19	7.04	3.20
ST100E	0.03	0.10	0.30	9.30	8.62	7.29	4.23
контроль А	0.01	0.07	0.85	5.92	8.18	7.81	6.26
контроль В	0.01	0.04	0.27	4.86	6.43	8.01	6.75
контроль А*	0.04	0.21	1.36	5.19	7.31	7.55	5.16
контроль В*	0.03	0.20	1.18	5.16	5.96	7.62	5.32

*аналіз під час другого тижня

Див. список номерів зразків в таблиці 72

Таблиця 73

Ефективність культури в колбах з *Saccharomyces cerevisiae*

Номер зразка	Ефективність (%) в наступні моменти часу (годин)			
	24	36	48	72
P	108.9	107.6	68.4	16.0
P1E	94.6	109.9	69.0	8.9
P5E	164.0	87.3	43.0	0.6
P10E	123.0	104.9	70.4	21.5
P50E	51.9	80.1	108.6	87.3
P100E	67.5	113.1	94.9	46.5
G	189.2	112.8	84.2	43.6
G1E	189.2	126.5	87.7	43.6
G5E	185.5	119.1	80.4	13.5
G10E	185.0	115.1	73.2	1.7
G50E	180.3	114.0	77.5	36.6
A	156.4	119.9	89.6	71.6
A1E	179.2	121.8	90.8	40.6
A5E	175.1	122.7	95.6	58.4
A10E	177.7	114.0	79.4	21.5
A50E	174.0	109.7	75.7	15.1
S	106.3	96.6	127.7	244.2
S1E	134.3	130.3	153.0	228.9
S5E	108.9	105.1	150.4	291.9
S10E	109.1	105.7	145.4	296.5
S30E	110.2	109.1	141.6	313.4
S50E*	105.5	119.9	171.3	349.2
S100E	129.9	145.1	174.5	195.1
C	157.1	103.6	69.3	98.3
C1E	165.7	107.6	75.7	21.0
C5E	172.9	108.4	71.9	21.7
C10E	169.6	105.0	67.5	5.4
C30E	169.8	111.6	73.8	37.9
C50E	172.7	106.6	73.1	27.5
C100E	168.1	93.8	75.2	16.7
ST	158.4	91.6	64.3	6.5
ST1E	164.6	99.8	60.8	16.0
ST5E	159.7	98.0	62.8	13.1
ST10E	166.4	96.5	66.5	10.4
ST30E	157.1	95.3	61.8	3.2
ST50E	157.0	112.1	89.0	49.2
ST100E	172.5	118.0	92.2	65.0
контроль А	109.8	112.0	98.7	96.2
контроль В	90.2	88.0	101.3	103.7
контроль А*	100.3	110.1	99.5	98.5
контроль В*	99.7	89.8	100.4	101.5

*аналіз під час другого тижня

Значення кількості клітин і процентної концентрації клітин в колбах з культурою *Saccharomyces cerevisiae* колби представлені в таблиці 74. Високу кількість клітин спостерігали у всіх колбах, однак виявилось, що не всі клітини виробляли етанол.

5

Таблиця 74

Кількість і процентна концентрація клітин культури *Saccharomyces cerevisiae*

Номер зразка	Кількість клітин (10 ⁸ клітин/мл)		Процентна концентрація клітин (клітини/клітини контролю·100)	
	24 години	72 години	24 години	72 години
P	0.62	0.96	97.7	139.0
P1E	0.35	1.18	54.1	170.9
P5E	1.13	1.93	177.3	279.5
P10E	0.59	1.42	91.8	205.6
P50E	0.32	1.40	49.4	202.8
P100E	0.45	1.94	70.6	281.0
G	0.74	3.48	116.5	504.0
G1E	0.68	3.65	107.1	528.6
G5E	0.62	3.87	96.5	560.5
G10E	0.70	2.73	109.5	395.4
G50E	0.46	2.10	71.8	304.1
A	0.55	3.53	86.0	511.2
A1E	0.83	3.45	130.7	499.6
A5E	0.67	3.53	104.8	511.2
A10E	0.53	1.95	83.6	282.4
A50E	0.66	1.62	103.5	234.6
S	0.44	1.11	69.5	160.8
S1E	0.44	1.10	68.2	159.3
S5E	0.23	0.99	36.5	143.4
S10E	0.39	0.73	61.2	105.4
S30E	0.31	0.71	48.3	102.1
S50E*	0.44	0.90	86.5	196.5
S100E	0.53	0.84	82.4	121.7
C	0.45	1.81	70.6	262.1
C1E	0.71	2.40	110.6	347.6
C5E	0.53	2.33	83.6	337.4
C10E	0.77	1.55	120.0	224.5
C30E	0.75	1.80	117.6	260.7
C50E	0.64	1.70	100.1	246.2
C100E	0.81	1.51	127.1	218.7
ST	0.75	1.75	117.6	253.4
ST1E	0.57	1.36	89.4	197.0
ST5E	0.58	1.49	90.7	215.8
ST10E	0.61	1.32	95.4	191.2
ST30E	0.59	0.60	91.8	86.9
ST50E	0.59	1.30	91.8	188.3
ST100E	0.41	1.24	63.5	179.6
контроль А	0.81	0.79	127.1	114.1
контроль В	0.47	0.59	72.9	85.9
контроль А*	0.66	0.42	131.2	91.7
контроль В*	0.35	0.50	69.0	108.1

- У колбі для посіву культури *Pichia stipitis* оптична густина (600 нм) становила 5,01, і концентрація клітин становила $3,30 \times 10^8$ клітин/мл. По 1 мл матеріалу з колби для посіву додавали в кожен з досліджуваних колб. Отже, вихідна концентрація клітин в кожній колбі становила $3,30 \times 10^6$ клітин/мл. Під час другого тижня випробування в колбі для посіву культури *Pichia stipitis* оптична густина (600 нм) становила 5,45, і концентрація клітин становила $3,83 \times 10^8$ клітин/мл. По 1 мл матеріалу з колби для посіву додавали в кожен з досліджуваних колб. Отже, вихідна концентрація клітин в кожній колбі становила $3,83 \times 10^6$ клітин/мл. Значення рН вмісту колби з культурою *Pichia stipitis* при відборі зразка в нульовий момент часу приведені в таблиці

75. Значення рН вмісту колби знаходилося в оптимальному інтервалі для росту культури *Pichia stipitis* (рН 4-7). Регулювання рН не було потрібне.

Таблиця 75

Значення рН вмісту колби з культурою *Pichia stipitis* при відборі зразка в нульовий момент часу

Номер зразка	рН	Номер зразка	рН
P	4.91	C	5.36
P1E	4.87	C1E	5.30
P5E	4.90	C5E	5.29
P10E	4.78	C10E	5.06
P50E	4.46	C30E	4.89
P100E	4.24	C50E	4.70
G	5.45	C100E	4.59
G1E	5.43	ST	4.93
G5E	5.48	ST1E	4.90
G10E	5.32	ST5E	4.81
G50E	4.99	ST10E	4.83
A	5.69	ST30E	4.91
A1E	5.66	ST50E	4.24
A5E	5.60	ST100E	4.07
A10E	5.58	контроль А	4.93
A50E	5.69	контроль В	4.91
S	5.00		
S1E	4.94		
S5E	4.86		
S10E	4.78		
S30E	4.51		
S50E	4.27		
S100E	4.08		

- 5 Значення концентрації етанолу і ефективності культури в колбах з *Pichia stipitis* представлені в таблиці 76 і 77. Найвищі концентрації етанолу отримані в зразках серій G і A. Колби C-30e, C-50e і C-100e також містили високі концентрації етанолу. Значення кількості клітин і процентної концентрації клітин в колбах з культурою *Pichia stipitis* представлені в таблиці 78. Низькі кількості клітин спостерігали в колбах з позначенням S. Низькі кількості клітин
- 10 спостерігали також в колбах, що містять зразки C, C-1e, C-5e і C-10e, при відборі зразків через 24 години.

Концентрація етанолу в колбах з культурою *Pichia stipitis*

Номер зразка	Концентрація етанолу (г/л) в наступні моменти часу (годин)						
	0	6	12	24	36	48	72
P	0.01	0.05	0.26	4.98	8.57	14.10	17.00
P1E	0.02	0.03	0.04	4.24	9.03	12.40	17.30
P5E	0.02	0.03	0.42	6.72	12.40	15.60	18.60
P10E	0.02	0.02	0.01	1.38	8.69	13.00	17.00
P50E	0.01	0.02	0.02	0.03	3.77	10.50	16.90
P100E	0.02	0.03	0.02	3.75	10.50	15.60	18.80
G	0.02	0.08	0.20	10.80	17.70	19.40	25.40
G1E	0.04	0.12	0.50	12.20	19.60	23.80	28.60
G5E	0.07	0.14	0.73	12.50	19.10	24.50	27.50
G10E	0.04	0.19	0.42	10.20	19.10	22.90	28.20
G50E	0.05	0.22	0.25	8.73	18.40	22.20	28.00
A	0.13	0.28	0.82	16.10	19.40	19.30	18.60
A1E	0.22	0.59	1.08	16.10	22.40	27.60	27.70
A5E	0.32	0.43	0.43	10.60	22.10	27.10	28.10
A10E	0.33	0.61	1.15	14.90	22.00	27.10	27.90
A50E	0.30	0.10	0.47	13.40	20.20	24.80	27.10
S	0.01	0.01	0.26	3.68	7.50	10.20	13.30
S1E	0.02	0.02	0.22	4.98	9.22	11.60	14.20
S5E	0.02	0.02	0.19	4.25	8.50	11.70	14.70
S10E	0.03	0.02	0.17	2.98	8.87	11.90	14.70
S30E	0.08	0.05	0.03	2.96	8.73	12.60	16.50
S50E	0.08	0.05	0.04	2.24	6.13	7.95	12.50
S100E	0.11	0.10	0.08	3.36	7.82	10.50	13.90
C*	0.02	0.03	0.05	0.23	1.66	2.68	6.57
C1E*	0.03	0.03	0.03	0.07	0.95	1.85	10.20
C5E*	0.03	0.02	0.04	0.05	0.37	1.59	4.80
C10E*	0.03	0.04	0.04	0.05	3.91	15.20	28.30
C30E	0.01	0.03	0.60	12.30	21.20	26.00	27.20
C50E	0.02	0.02	0.45	12.30	19.50	23.80	29.20
C100E	0.05	0.04	0.38	11.40	18.70	22.90	27.70
ST	0.03	0.03	0.37	6.69	10.70	13.50	10.90
ST1E	0.01	0.00	0.48	5.24	9.37	12.50	15.70
ST5E	0.02	0.03	0.29	5.45	10.10	11.90	14.70
ST10E	0.02	0.02	0.42	5.60	9.44	12.20	14.90
ST30E	0.05	0.04	0.73	5.70	9.50	12.10	15.20
ST50E	0.02	0.05	0.19	5.16	9.47	12.70	15.20
ST100E*	0.07	0.15	0.11	4.98	10.70	15.40	18.80
контроль А	0.02	0.03	0.37	4.05	7.50	9.24	11.50
контроль В	0.02	0.02	0.30	4.22	7.44	9.44	11.50
контроль А*	0.02	0.05	0.69	4.86	8.69	11.10	16.40

Ефективність культури в колбах з *Pichia stipitis*

Номер зразка	Ефективність (%) в наступні моменти часу (годин)			
	24	36	48	72
P	120.3	114.7	151.0	147.8
P1E	102.4	120.9	132.8	150.4
P5E	162.3	166.0	167.0	161.7
P10E	33.3	116.3	139.2	147.8
P50E	0.7	50.5	112.4	147.0
P100E	90.6	140.6	167.0	163.5
G	260.9	236.9	207.7	220.9
G1E	294.7	262.4	254.8	248.7
G5E	301.9	255.7	262.3	239.1
G10E	246.4	255.7	245.2	245.2
G50E	210.9	246.3	237.7	243.5
A	388.9	259.7	206.6	161.7
A1E	388.9	299.9	295.5	240.9
A5E	256.0	295.9	290.1	244.3
A10E	359.9	294.5	290.1	242.6
A50E	323.7	270.4	265.5	235.7
S	88.9	100.4	109.2	115.7
S1E	120.3	123.4	124.2	123.5
S5E	102.7	113.8	125.3	127.8
S10E	72.0	118.7	127.4	127.8
S30E	71.5	116.9	134.9	143.5
S50E	54.1	82.1	85.1	108.7
S100E	81.2	104.7	112.4	120.9
C*	4.2	17.0	22.2	43.2
C1E*	1.4	9.7	15.4	67.1
C5E*	0.9	3.8	13.2	31.6
C10E*	0.9	40.1	126.1	246.1
C30E	297.1	283.8	278.4	236.5
C50E	297.1	261.0	254.8	253.9
C100E	275.4	250.3	245.2	240.9
ST	161.6	143.2	144.5	94.8
ST1E	126.6	125.4	133.8	136.5
ST5E	131.6	135.2	127.4	127.8
ST10E	135.3	126.4	130.6	129.6
ST30E	137.7	127.2	129.6	132.2
ST50E	124.6	126.8	136.0	132.2
ST100E*	120.3	109.7	127.8	123.7
контроль А	97.8	100.4	98.9	100.0
контроль В	101.9	99.6	101.1	100.0
контроль А*	89.8	89.1	92.1	107.9
контроль В*	110.2	110.8	107.9	92.1

*аналіз під час другого тижня

Таблиця 78

Кількість і процентна концентрація клітин культури *Pichia stipitis*

Номер зразка	Кількість клітин (10 ⁸ клітин/мл)		Процентна концентрація клітин (клітини/клітини контролю·100)	
	24 години	72 години	24 години	72 години
P	2.78	11.00	80.6	148.0
P1E	2.10	7.20	60.9	96.9
P5E	2.93	9.68	84.9	130.3
P10E	1.42	7.73	41.2	104.0
P50E	0.33	8.63	9.6	116.2
P100E	1.58	8.25	45.8	111.0
G	1.50	14.20	43.5	191.1
G1E	3.90	8.10	113.0	109.0
G5E	2.93	6.45	84.9	86.8
G10E	4.35	13.30	126.1	179.0
G50E	3.75	11.60	108.7	156.1
A	7.43	8.55	215.4	115.1
A1E	4.13	9.53	119.7	128.3
A5E	3.68	9.75	106.7	131.2
A10E	4.50	7.50	130.4	100.9
A50E	6.23	5.33	180.6	71.7
S	3.53	5.55	102.3	74.7
S1E	3.00	3.30	87.0	44.4
S5E	3.68	3.00	106.7	40.4
S10E	1.73	5.78	50.1	77.8
S30E	2.55	5.48	73.9	73.8
S50E	2.63	6.15	76.2	82.8
S100E	2.25	4.43	65.2	59.6
C*	0.00	0.26	0.00	7.2
C1E*	0.00	0.36	0.00	9.9
C5E*	0.00	0.08	0.00	2.1
C10E*	0.00	5.85	0.00	160.7
C30E	5.78	4.20	167.5	56.5
C50E	3.40	7.35	98.6	98.9
C100E	1.98	6.60	57.4	88.8
ST	2.55	7.65	73.9	103.0
ST1E	2.00	8.70	58.0	117.1
ST5E	1.85	6.75	53.6	90.8
ST10E	1.83	5.40	53.0	72.7
ST30E	2.78	6.15	80.6	82.8
ST50E	1.33	3.45	38.6	46.4
ST100E*	4.35	3.83	59.8	105.2
контроль А	3.60	7.13	104.3	96.0
контроль В	3.30	7.73	95.7	104.0
контроль А*	7.50	3.23	103.0	88.7
контроль В*	7.05	4.05	96.8	111.3

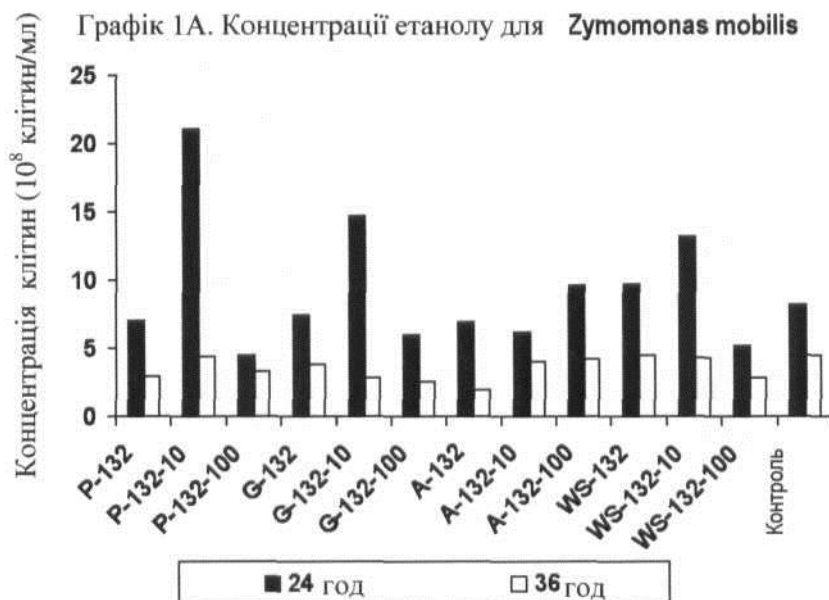
*аналіз під час другого тижня

Суть результатів по токсичності для клітин *Zygomonas mobilis*

5 Як показано на графіку 1А, підвищені кількості клітин (наприклад, більше ніж в контрольному зразку) спостерігали в зразках, що містять P-132-10, G-132-10 і WS-132-10, в момент часу через 24 години. Кількість клітин в присутності всіх інших зразків була порівнянна з контрольним зразком. Це спостереження показує, що субстрат не були токсичними відносно *Zygomonas mobilis* протягом 24 годин після посіву.

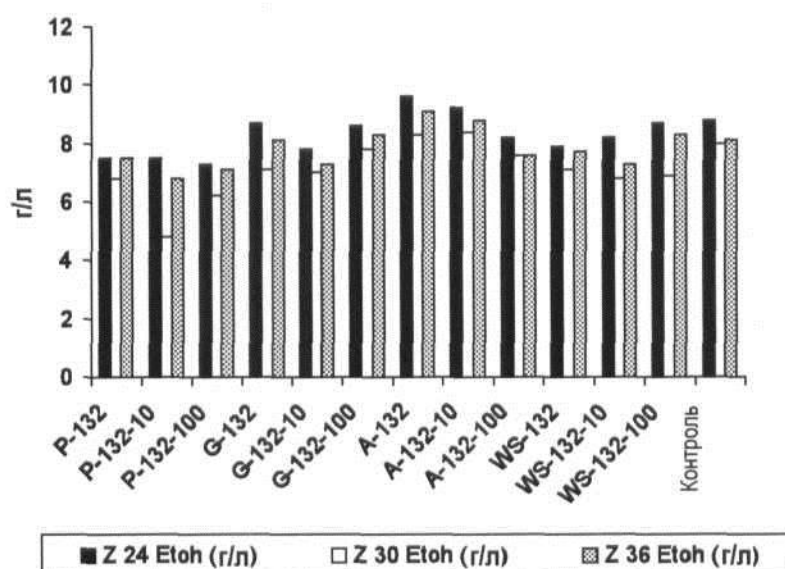
10 У момент часу через 36 годин зменшення кількості клітин (наприклад, внаслідок втрати клітин або загибелі клітин) спостерігали для всіх зразків, включаючи контрольний. Найбільше

- зниження кількості клітин спостерігали для тих зразків, які містили P-132-10 і G-132-10. Вірогідна причина цього ефекту є загальною для всіх зразків, включаючи контрольний зразок. Таким чином, причина цього ефекту полягає не в досліджуваних субстратах, тому що вони відрізняються для кожного зразка і не містяться в контрольному зразку. Можливе роз'яснення цього спостереження включають неправильні для культури умови (наприклад, температура, склад середовища) або концентрації етанолу в зразку.

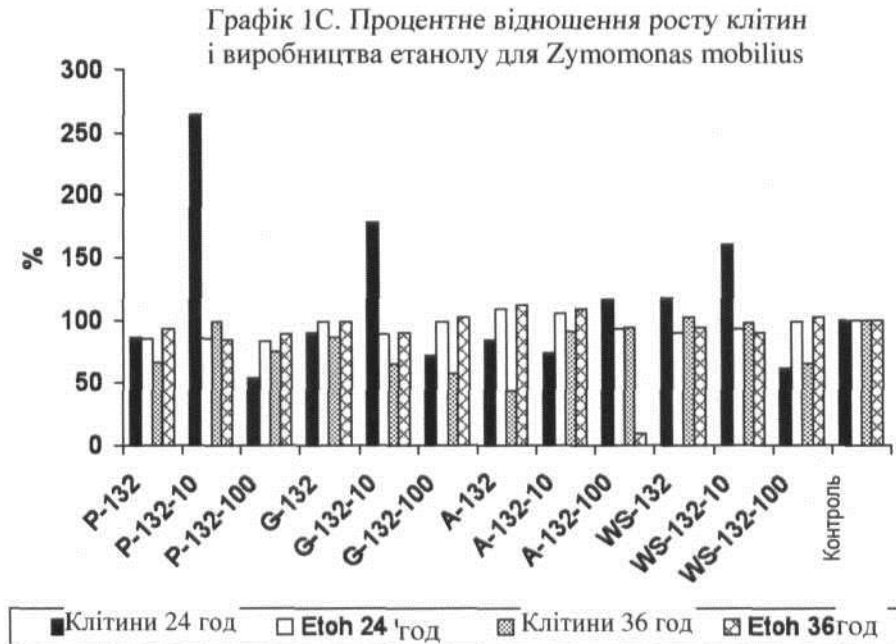


- Як показано на графіку 1В, всі клітини виробляли порівнянні кількості етанолу (наприклад, 5-10 г/л) в кожний момент часу, незалежно від субстрату. Згідно з даними про кількість клітин, представленими на графіку 1А, концентрація етанолу в кожному зразку досягала максимуму через 24 години. На відміну від даних про кількість клітин, концентрація етанолу не зменшувалася в подальші моменти часу. Це очікувалося, тому що етанол не видаляли з системи. Крім того, ці дані свідчать, що виробництво етанолу в цих зразках може відбуватися в результаті ферментації глюкози в середовищі культури. Жоден з досліджених субстратів не показав збільшення виробництва етанолу.

Графік 1В. Концентрації етанолу для *Zymomonas mobilis*



Графіки 1А і 1В спільно свідчать, що концентрація етанолу, яка складає більше ніж приблизно 6 г/л, може бути токсичною для *Zymomonas mobilis*. Ці дані також представлені як процентне нормоване відношення до контрольного зразка, як показано на графіку 1С.



5

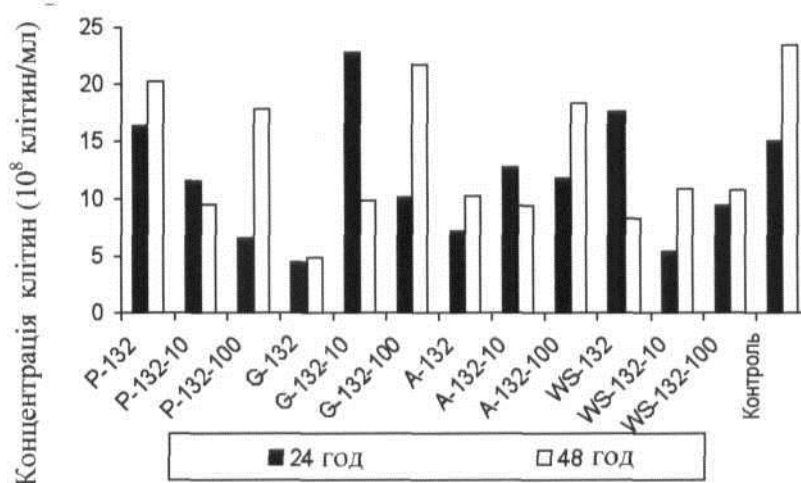
Pichia stipitis

Як показано на графіку 2А, кількість клітин була порівнянна з контрольним зразком. Крім того, хоча спостерігали дещо зменшену кількість клітин в зразках, що містять G-132 і WS-132, зменшену кількість клітин не спостерігали для G-132-10, G-132-100, A-132-10 або A-132-100. Таким чином, малоімовірно, що субстрати А або G є токсичними. Навпаки, зменшена кількість клітин, що спостерігається для G-132 і WS-132, ймовірно, викликана аномалією експерименту або присутністю непереробленого субстрату, що якимось чином перешкоджає росту клітин. Загалом ці дані свідчать про те, що глюкоза, присутня в контрольному і експериментальному зразках, ймовірно, є достатньою для забезпечення оптимального росту *Pichia stipitis*, і що присутність додаткового субстрату в зразку не збільшує цю швидкість росту. Дані результати також свідчать, що жоден із зразків не є токсичним для *Pichia stipitis*.

10

15

Графік 2А. Концентрація клітин для *Pichia stipitis*

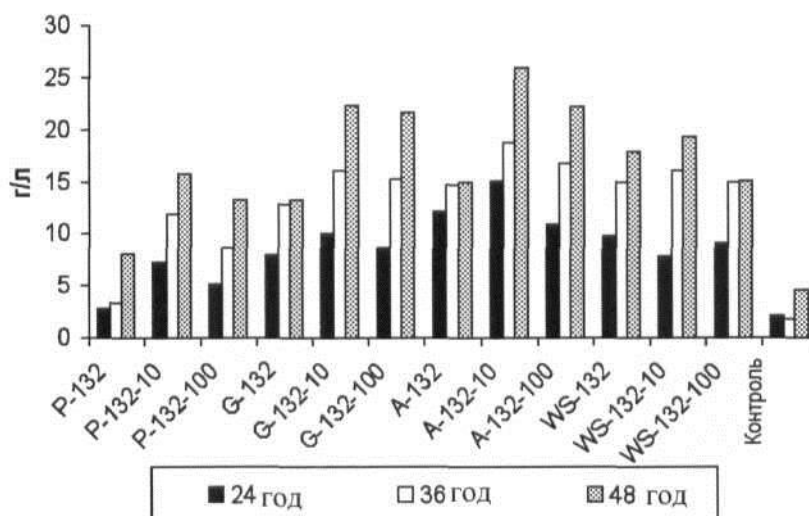


Як показано на графіку 2В, незважаючи на аналогічну кількість клітин, представлену на графіку 2В, значно збільшене виробництво етанолу спостерігали для всіх зразків, що містять досліджуваний субстрат. Концентрації етанолу збільшувалися з плином часу для кожного з досліджених моментів часу. Найвищу концентрацію етанолу спостерігали для A-132-10 в момент часу через 48 годин (наприклад, приблизно 26,0 г/л). Порівнюючи концентрації

20

субстрату з найвищими рівнями виробництва етанолу з даними про кількість клітин, представленими на графіку 2В, видно, що культура *Pichia stipitis* не є чутливою до збільшення концентрації етанолу. Крім того, виробництво етанолу виявляється таким, що залежить не від кількості клітин, а від типу субстрату, присутнього в зразку.

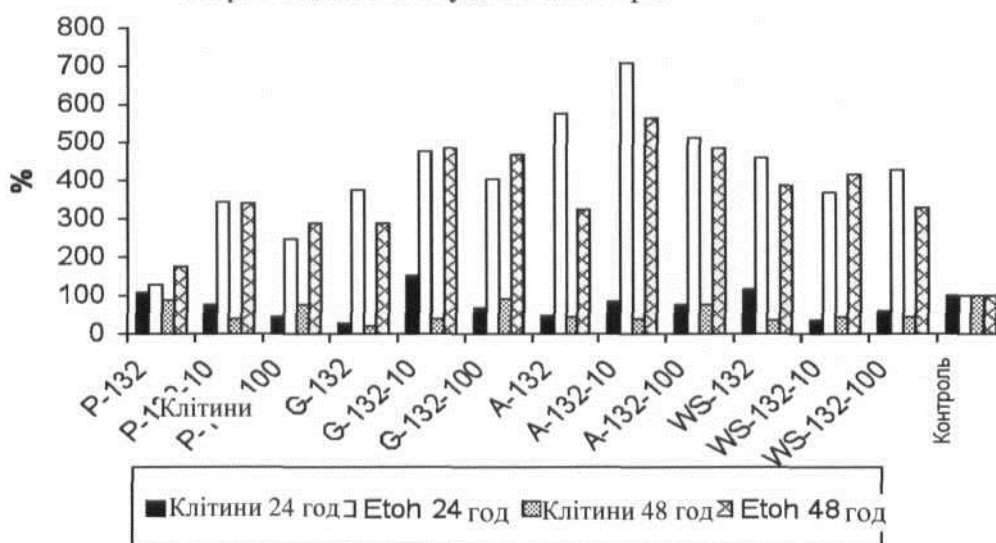
Графік 2В. Концентрації етанолу для *Pichia stipitis*



5

Результати на графіках 2А і 2В спільно свідчать, що досліджувані субстрати не забезпечують збільшення росту *Pichia stipitis*, однак вони значно збільшують кількість етанолу, що виробляється клітинами цього типу. Ці дані також представлені як процентне нормоване відношення до контрольного зразка, як показано на графіку 2С.

Графік 2С. Процентне відношення росту клітин і виробництва етанолу для *Pichia stipitis*

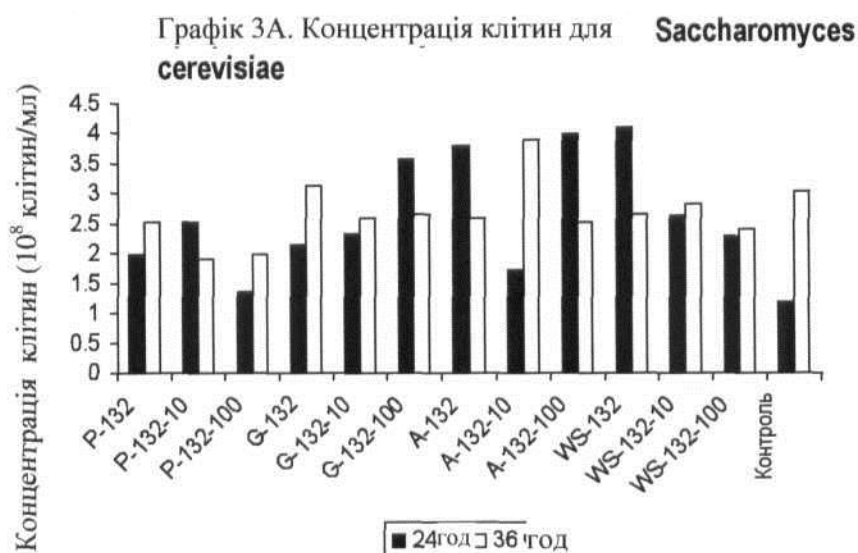


10

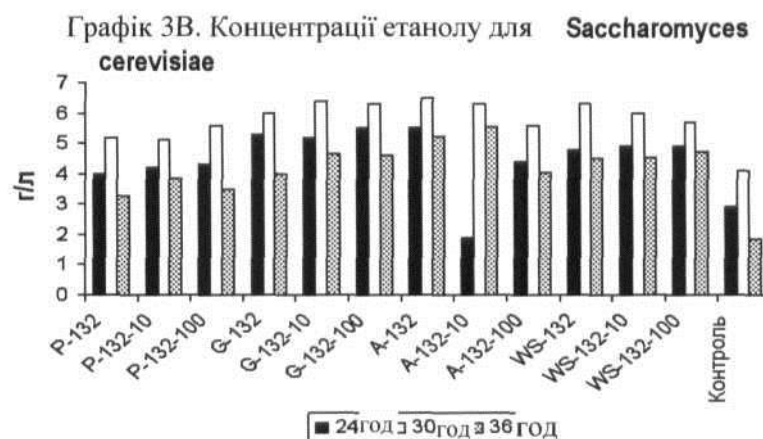
Saccharomyces cerevisiae

Як показано на графіку 3А, зразки G-132-100, A-132, A-132-10, A-132-100 і WS-132 забезпечували дещо підвищену кількість клітин в порівнянні з контрольным зразком. Жоден зразок не показав значного скорочення кількості клітин. Ці результати свідчать, що жоден із зразків не є токсичним для *Saccharomyces cerevisiae*.

15

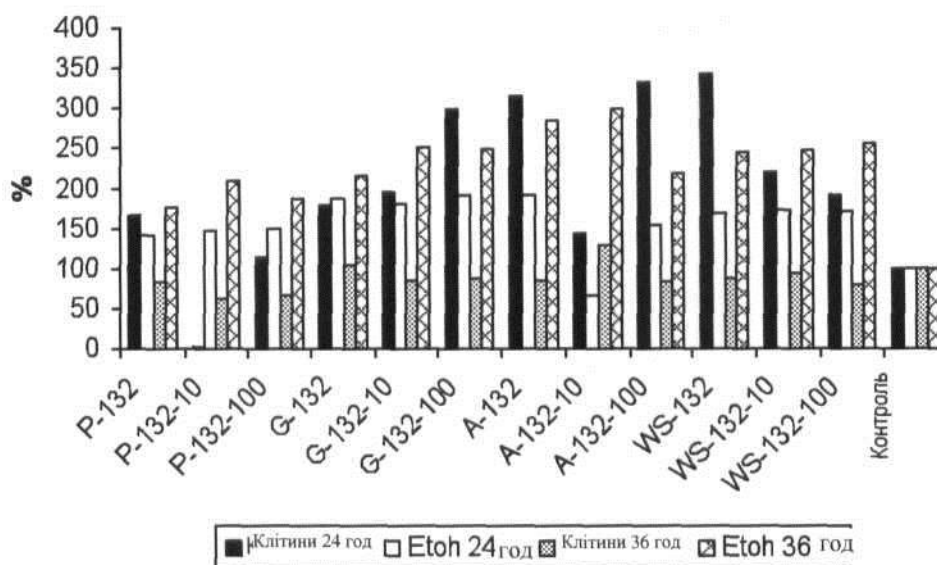


Як показано на графіку 3В, збільшення виробництва етанолу спостерігали для оброблених клітин кожного типу в порівнянні з контрольним зразком. Зіставлення цих зразків, що містять найвищу кількість етанолу, з даними про кількість клітин, представленими на графіку 3А, свідчить, що концентрації етанолу, що перевищують 5 г/л, можуть чинити несприятливий вплив на кількість клітин. Однак це спостереження має місце не для всіх зразків.



Ці дані також представлені як процентне нормоване відношення до контрольного зразка, як показано на графіку 3С.

Графік 3С. Процентне відношення росту клітин і виробництва етанолу для *Saccharomyces cerevisiae*



На закінчення, жоден із досліджених зразків не виявився токсичним у випадку *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* або *Saccharomyces cerevisiae*. Крім того, культура *Pichia stipitis* виявилася найбільш ефективною з даних трьох типів клітин для виробництва етанолу з досліджених в експериментах субстратів.

Інші варіанти здійснення

Описаний ряд варіантів здійснення даного винаходу. Проте, буде зрозуміло, що можна виробити різні модифікації без відхилення від суті і виходу за межі об'єму даного винаходу.

Наприклад, волокна можуть бути присутніми в будь-якій бажаній формі і можуть мати ряд різноманітних морфологій. Як правило, бажано, щоб целюлозні матеріали мали високу питому поверхню. У деяких випадках волокна можна впроваджувати в одношарові або багатшарові листи, наприклад, волокна можуть являти собою частину високоефективного сухого повітряного пилового фільтра (HEPA) або подібних виробів. Листовий матеріал може мати питому поверхню, що складає, наприклад, приблизно від 1 до 500 м²/г. Волокнистий матеріал може бути накладним, наприклад, отриманим аеродинамічним способом з розплаву, складчастим, у вигляді сітки або решітки, або виготовленим в іншій геометрії. Волокна можуть бути екструдованими або спільно екструдованими.

Волокна можуть мати будь-який бажаний розмір частинок, від нанорозміру, наприклад, менше ніж приблизно 1000 нм, наприклад, менше ніж 500 нм, 250 нм, 100 нм, 50 нм, 25 нм або навіть менше ніж 1 нм, до більш крупних частинок, розмір яких складає, наприклад, більше ніж 100 мкм, 200 мкм, 500 мкм або навіть 1000 мкм, або агломератів частинок.

Хоча субстрати біомаси обговорювалися в даному документі, дані субстрати можна використати в поєднанні з іншими субстратами, наприклад, неорганічними і синтетичними субстратами, описаними у тимчасовій патентній заявці США № 61/252300, поданій 16 жовтня 2009 р., повний опис якої включений в даний документ за допомогою посилання.

Волокна або волокнистий матеріал, що містить волокна, можна попередньо обробляти мікроорганізмом і/або ферментом, і/або волокна або волокнистий матеріал можна приводити в контакт з мікроорганізмом і/або ферментом в ході біопроцесу, включаючи оцукрювання або ферментацію.

Як обговорювалося вище, ферменти можна іммобілізувати на волокнах замість мікроорганізмів або разом з ними.

Ферменти і знищуючі біомасу організми, які розкладають біомасу, що включає тому числі целюлозні і/або лігнінові компоненти біомаси, містять або виробляють різні целюлітичні ферменти (целюлази), лігнінази або різні низькомолекулярні знищуючі біомасу метаболіти. Ці ферменти можуть являти собою комплекс ферментів, які чинять синергетичну дію, розкладаючи кристалічні целюлозні або лігнінові компоненти біомаси. Приклади целюлітичних ферментів включають: ендоглюканази, целобіогідролази і целобіази (β-глюкозидази). У процесі оцукрювання целюлозний субстрат спочатку гідролізується у випадкових положеннях, утворюючи олігомерні проміжні продукти. Ці проміжні продукти стають потім субстратами для

розщеплюючих екзоглюканаз, включаючи целобіогідразу, які утворюють целобіозу з кінцевих ланок целюлозного полімеру. Целобіоза являє собою водорозчинний 1,4-зв'язаний димер глюкози. Нарешті, целобіаза розщеплює целобіозу з утворенням глюкози.

Целюлаза здатна розкласти біомасу і може бути грибового або бактеріального походження. Прийнятні ферменти включають целулази родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, *Chrysosporium* і *Trichoderma* і включають види *Humicola*, *Coprinus*, *Thielavia*, *Fusarium*, *Myceliophthora*, *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Scytalidium*, *Penicillium* або *Aspergillus* (див., наприклад, європейський патент № 458162), зокрема, отримані вибором штамів з видів *Humicola insolens* (перекласифікований як *Scytalidium thermophilum*, див., наприклад, патент США № 4435307), *Coprinus cinereus*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Meripilus giganteus*, *Thielavia terrestris*, видів *Acremonium*, включаючи *Acremonium persicinum*, *Acremonium acremonium*, *Acremonium brachypenum*, *Acremonium dichromosporum*, *Acremonium obclavatum*, *Acremonium pinkertoniae*, *Acremonium roseogriseum*, *Acremonium incoloratum* і *Acremonium furatum*; переважно з видів *Humicola insolens* DSM 1800, *Fusarium oxysporum* DSM 2672, *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65, вид *Cephalosporium RYM-202*, вид *Acremonium* CBS 478.94, вид *Acremonium* CBS 265.95, *Acremonium persicinum* CBS 169.65, *Acremonium acremonium* AHU 9519, вид *Cephalosporium* CBS 535.71, *Acremonium brachypenum* CBS 866.73, *Acremonium dichromosporum* CBS 683.73, *Acremonium obclavatum* CBS 311.74, *Acremonium pinkertoniae* CBS 157.70, *Acremonium roseogriseum* CBS 134.56, *Acremonium incoloratum* CBS 146.62 і *Acremonium furatum* CBS 299.70H. Целюлітичні ферменти можна також отримувати з *Chrysosporium*, переважно штаму *Chrysosporium lucknowense*. Крім того, можна використовувати *Trichoderma* (зокрема, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, і *Trichoderma koningii*), алкалофільні бацили (див., наприклад, патент США № 3844890 і європейський патент № 458162) і *Streptomyces* (див., наприклад, європейський патент № 458162).

Прийнятні целобіази включають целобіазу з *Aspergillus niger*, що продається під торговим найменуванням NOVOZYME 188™.

Можна використовувати комплексні ферменти, в тому числі ті, які постачає фірма Genencor під торговим найменуванням ACCELLERASE®, наприклад, комплексний фермент Accellerase® 1500. Комплексний фермент Accellerase® 1500 має багатофункціональну ферментативну активність, діючи, головним чином, як екзоглюканаза, ендоглюканаза (2200-2800 одиниць СМС/г), геміцелюлаза і β-глюкозидаза (525-775 одиниць рNPG/г), і має значення pH від 4,6 до 5,0. Активність комплексного ферменту як ендоглюканази виражена в одиницях активності відносно карбоксиметилцелюлози (одиниці СМС), в той час як його активність як β-глюкозидази виражена в одиницях активності відносно пара-нітрофеніл-пара-D-глюкопіранозиду (одиниці рNPG). У одному варіанті здійснення використовують суміш комплексного ферменту Accellerase® 1500 і целобіази NOVOZYME™ 188.

Відповідно, інші варіанти здійснення знаходяться в межах наступної формули винаходу.

40

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Спосіб ферментації низькомолекулярного цукру, який включає:
 контакт низькомолекулярного цукру в середовищі з листом, що містить окислені волокна біомаси і ферментуючий мікроорганізм, іммобілізований на волокнах; і
 ферментацію низькомолекулярного цукру в умовах, придатних для конверсії вказаного цукру в органічну кислоту ферментуючим мікроорганізмом;
 причому волокна біомаси окислені в окислювальному середовищі способом окислення, вибраним з групи, яка складається з опромінення дозою, що становить від 5 до 60 Мрад, хімічного окислення при рівні pH нижче приблизно 5,5, ультразвукової обробки і піролізу.
2. Спосіб за п. 1, в якому органічну кислоту вибирають з групи, яка складається з масляної кислоти, молочної кислоти, оцтової кислоти, пропіонової кислоти, бурштинової кислоти, 3-гідроксипропіонової кислоти, солі будь-якої з вказаних кислот і сумішей будь-якої з вказаних кислот і відповідних солей.
3. Спосіб за п. 2, в якому органічна кислота являє собою масляну кислоту.
4. Спосіб за п. 2, в якому органічна кислота являє собою молочну кислоту.
5. Спосіб за п. 1, який додатково включає ферментацію органічної кислоти у спирт.
6. Спосіб за п. 5, в якому спирт являє собою бутанол.
7. Спосіб за п. 1, в якому волокна мають нанорозмірну середню величину частинок.
8. Спосіб за п. 1, в якому мікроорганізм являє собою бактерію.

9. Спосіб за п. 1, в якому волокна окислені за допомогою опромінення, а опромінення здійснюють іонізуючим випромінюванням.

10. Спосіб за п. 9, в якому опромінення здійснюють з використанням пучка частинок.

11. Спосіб за п. 1, в якому волокна біомаси включають целюлозний або лігноцелюлозний матеріал.

12. Спосіб за п. 1, в якому волокна біомаси одержують з біомаси, вибраної з групи, яка складається з паперу, паперових виробів, відходів паперу, деревини, деревностружкових плит, тирси, сільськогосподарських відходів, стоків, силосу, трав, рисового лушпиння, вичавок, джуту, коноплі, льону, бамбуку, мексиканської агави, манільського прядива, соломи, стрижнів кукурудзяних качанів, кукурудзяної соломи, проса прутоподібного, люцерни, сіна, кокосових волокон, бавовни, морських водоростей, інших водоростей і їх сумішей.

13. Спосіб за п. 1, в якому волокна біомаси одержують з початкового матеріалу біомаси, який містить внутрішні волокна і який був подрібнений до такої міри, що його внутрішні волокна стали практично відкритими.

14. Спосіб за п. 1, в якому волокна біомаси мають пористість, яка становить більше ніж 70 %.

15. Спосіб за п. 1, в якому волокна біомаси екструдують або спільно екструдують.

16. Спосіб за п. 1, в якому лист складений, зігнутий або пропущений через сито або сітку.

17. Спосіб за п. 1, який додатково включає виділення волокон біомаси після ферментації і повторне використання волокон у другому процесі ферментації, що слідує.

18. Спосіб за п. 1, в якому лист являє собою багат шаровий лист.

19. Спосіб за п. 9, в якому опромінення здійснюють, використовуючи пучок електронів.

20. Спосіб за п. 1, в якому окислені волокна біомаси одержують за допомогою окислення вихідної волокнистої біомаси до такої міри, що на вихідній волокнистій біомасі утворюються функціональні групи.

21. Спосіб за п. 7, в якому функціональні групи вибирають з групи, яка складається з гідроксильних груп, альдегідних груп, кетонних груп, складноефірних груп або карбоксильних груп.

22. Спосіб за п. 7, в якому мікроорганізм прикріплюється до окислених волокон біомаси через функціональні групи.

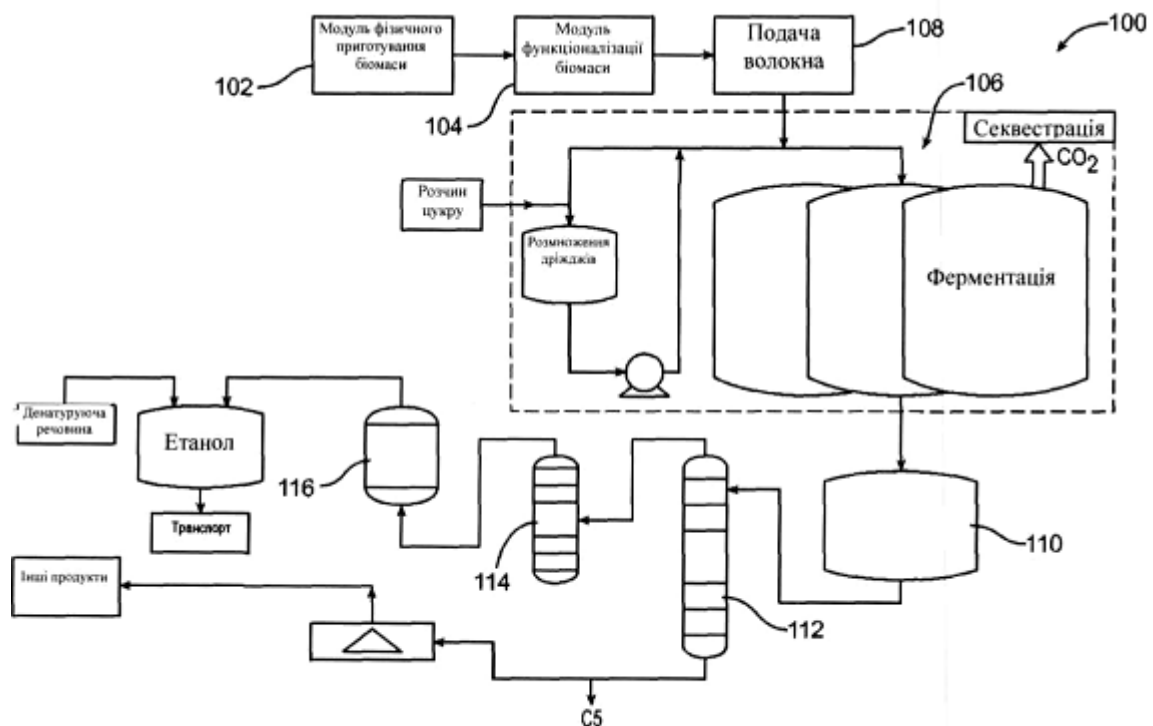


Fig. 1

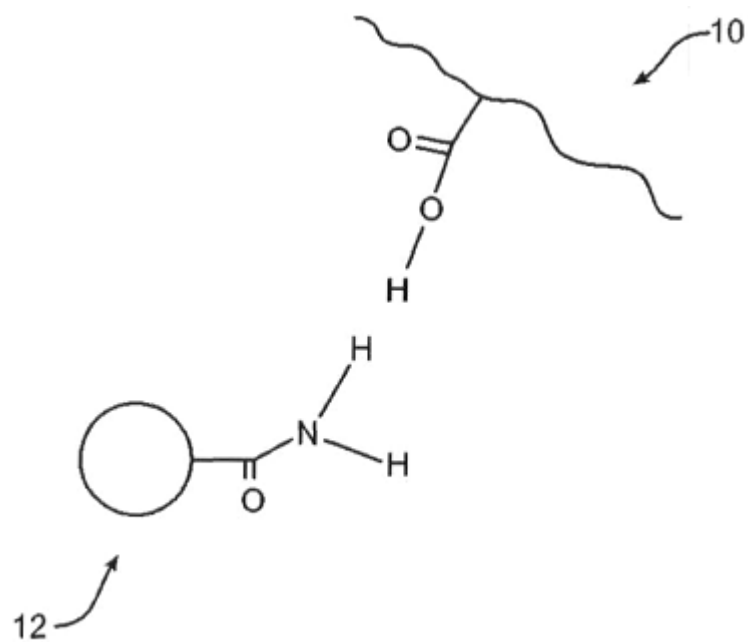


Fig. 2

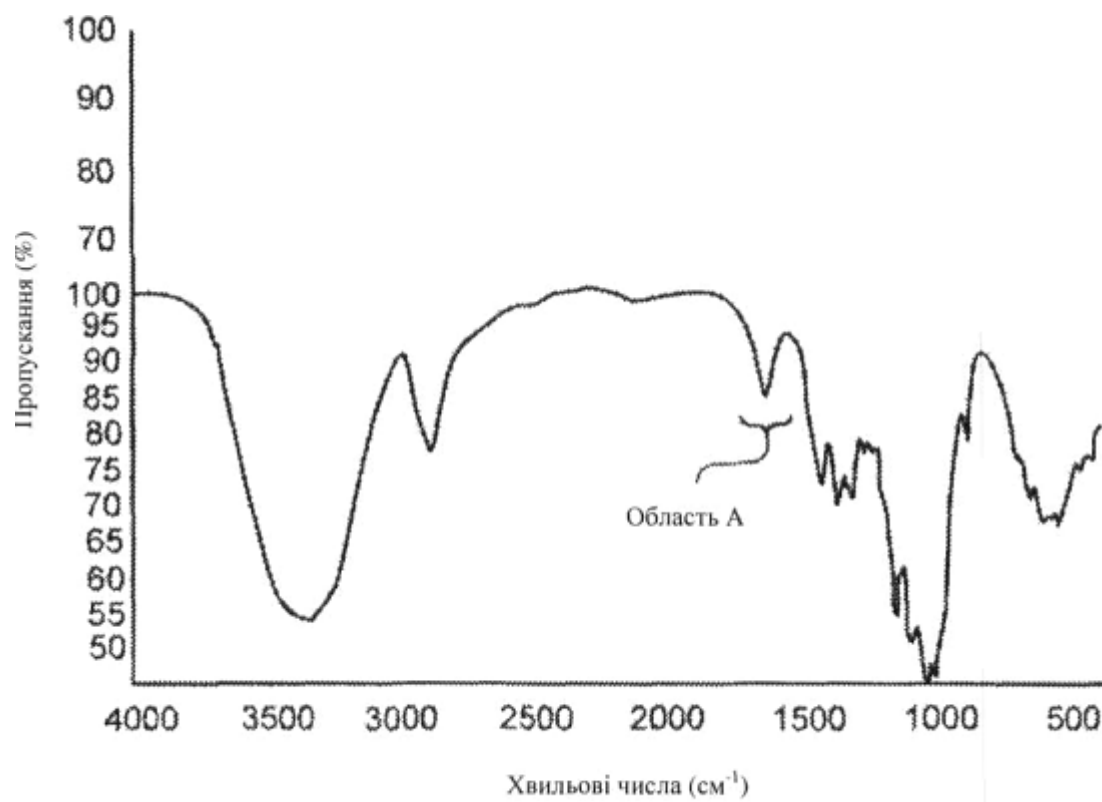


Fig. 3

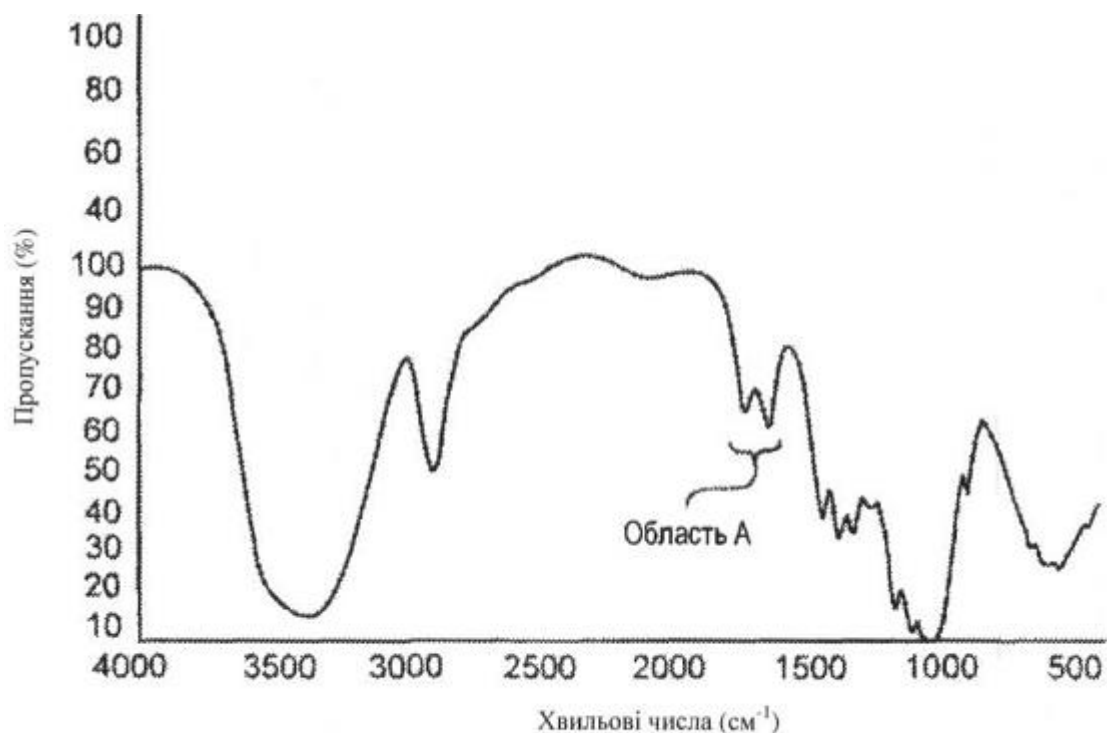


Fig. 4

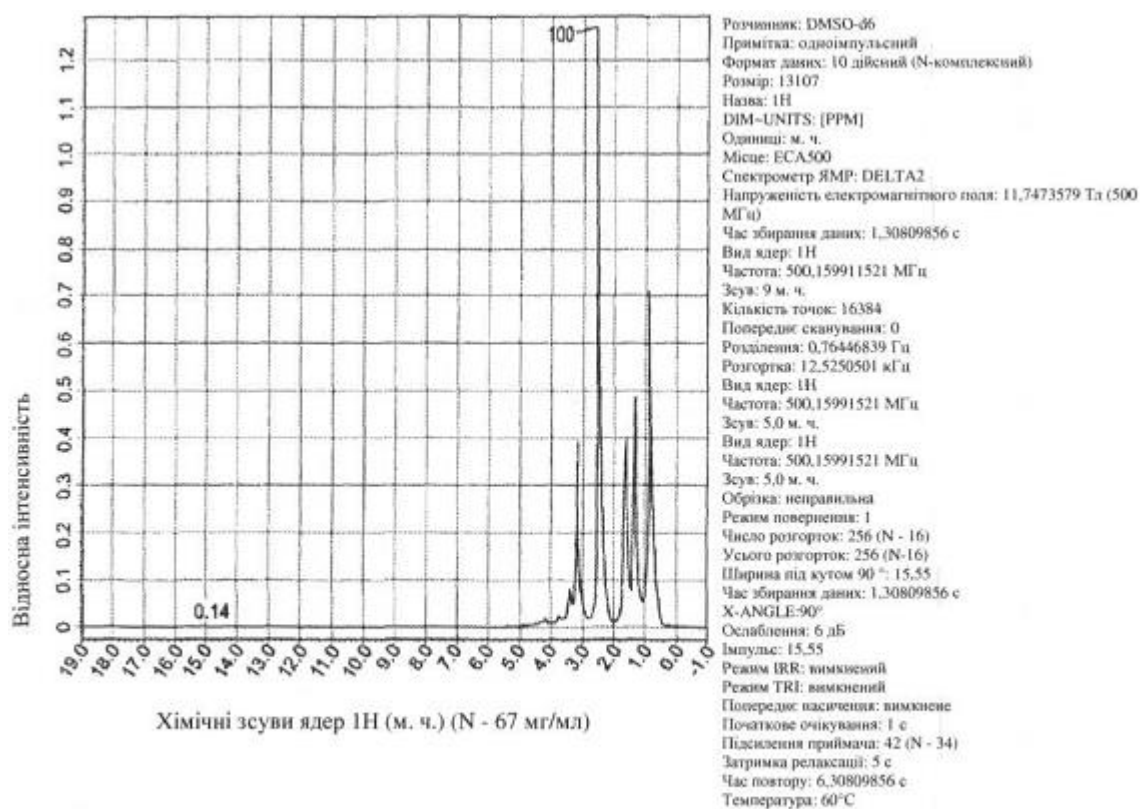


Fig. 5A

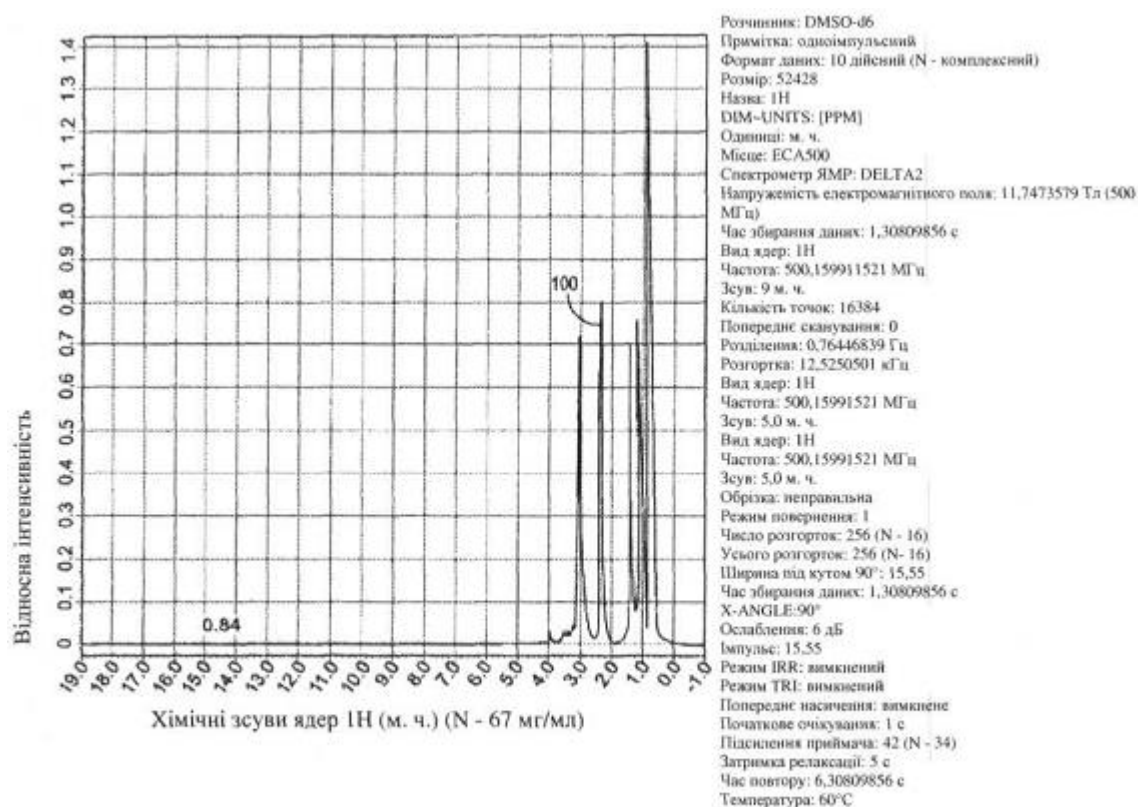


Fig. 5B

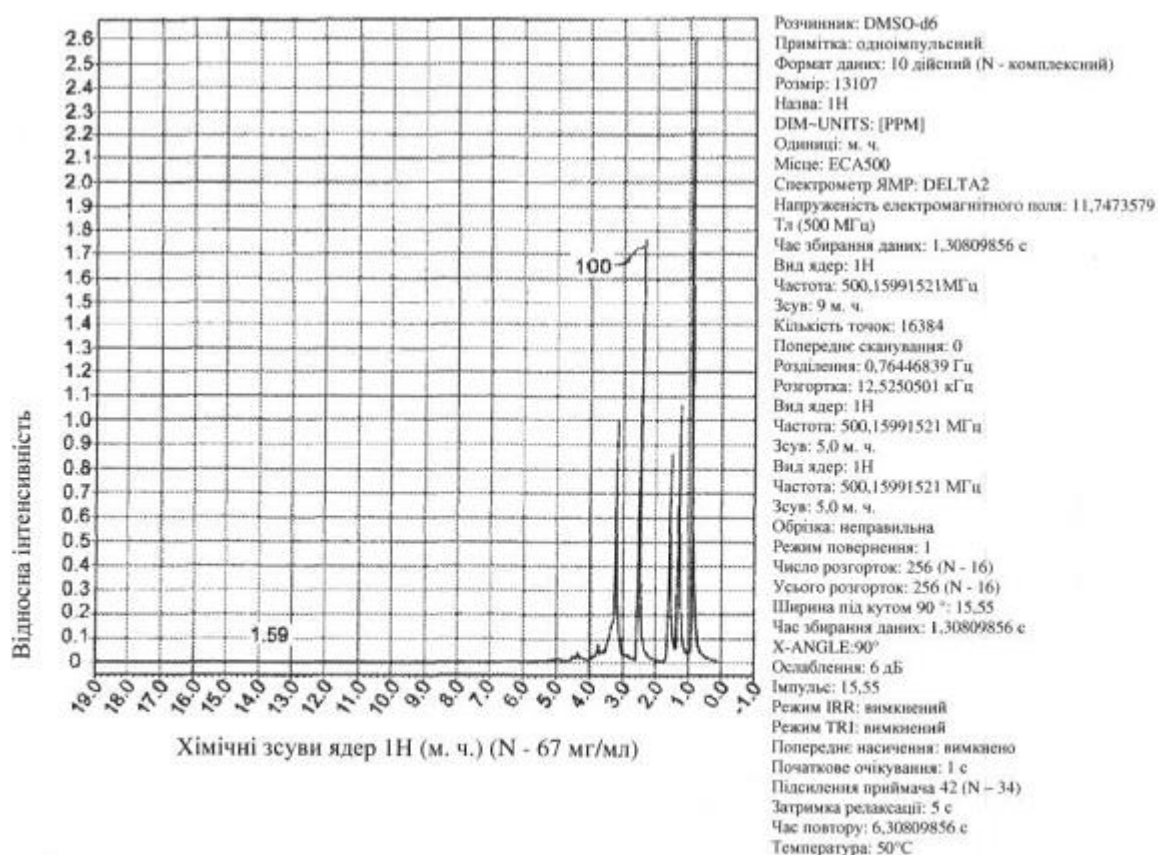
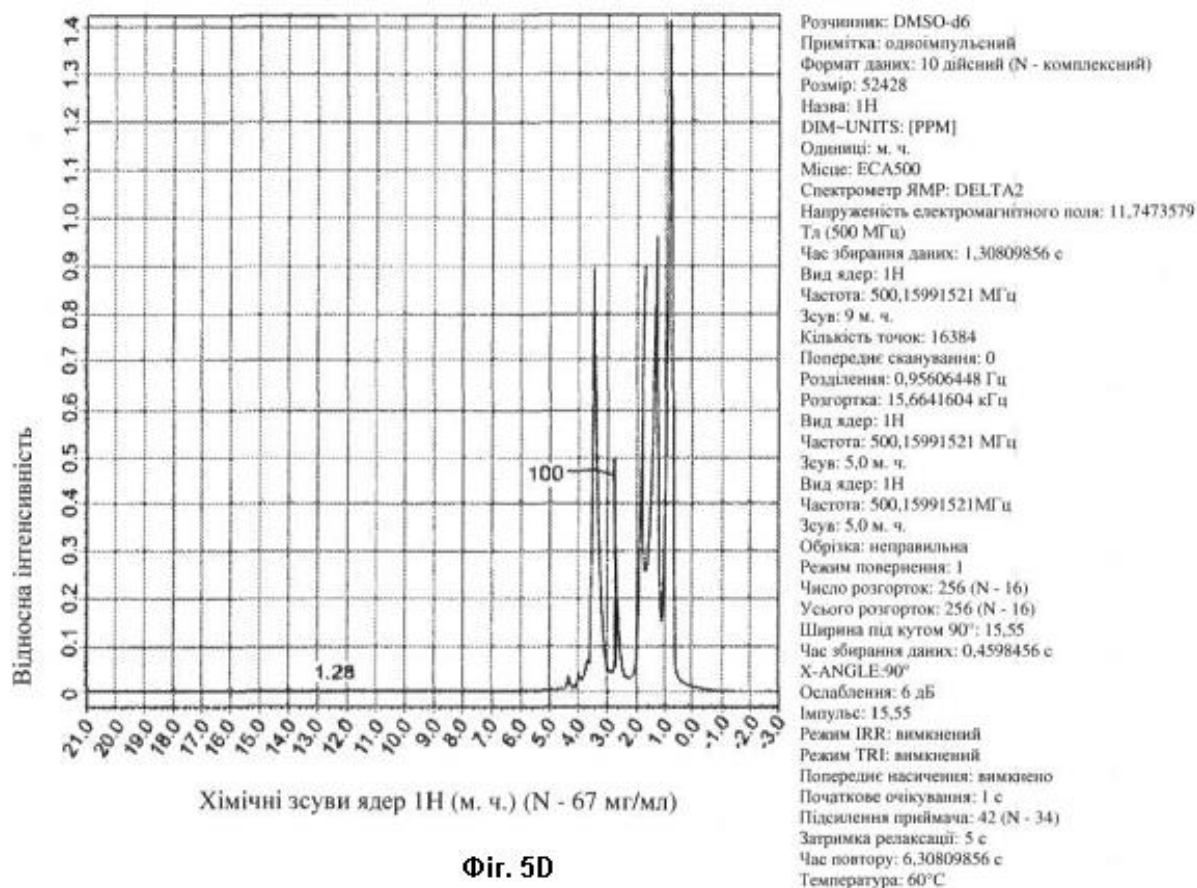
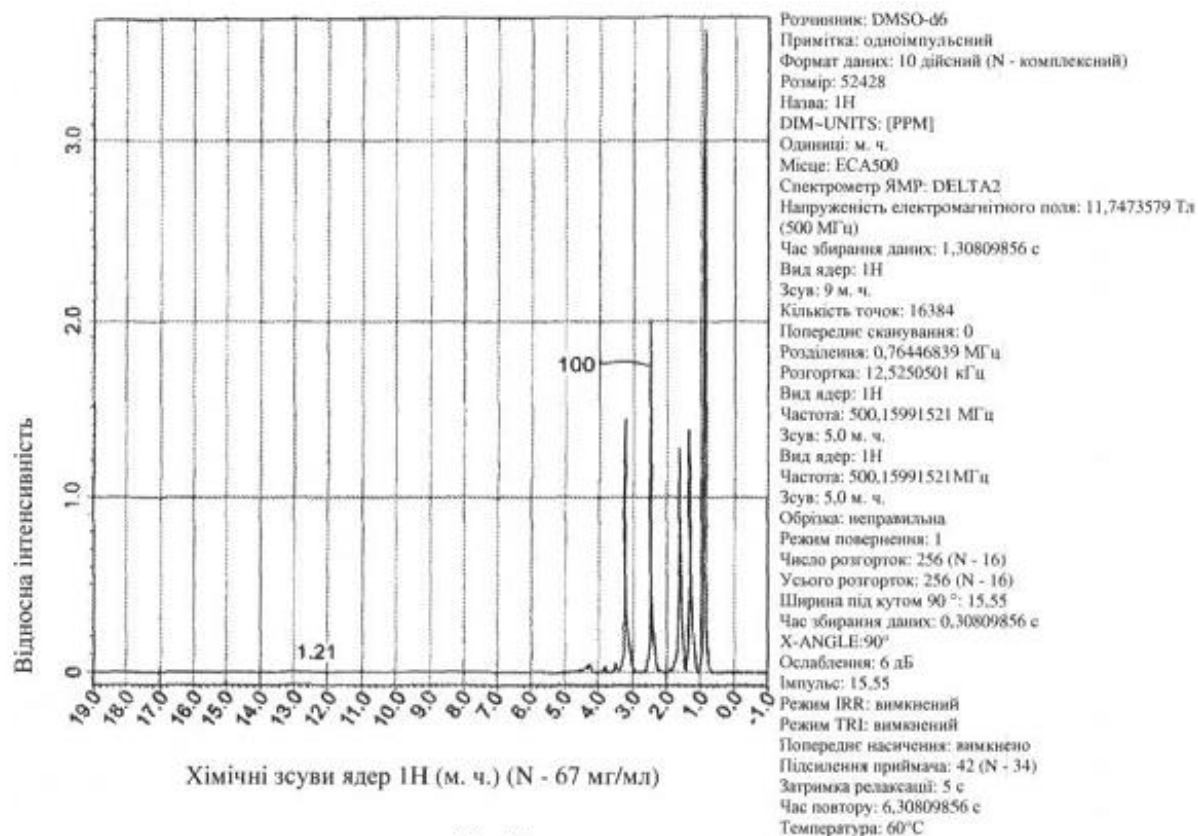


Fig. 5C



Фиг. 5D



Фиг. 5E

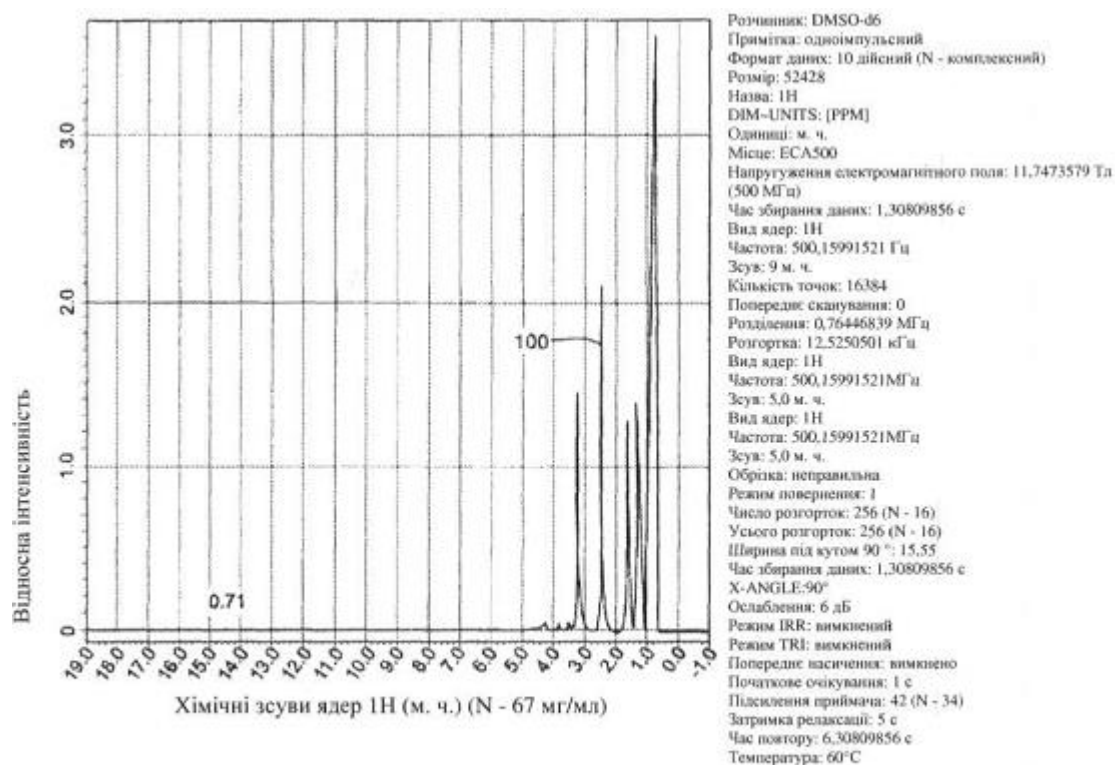


Fig. 5F

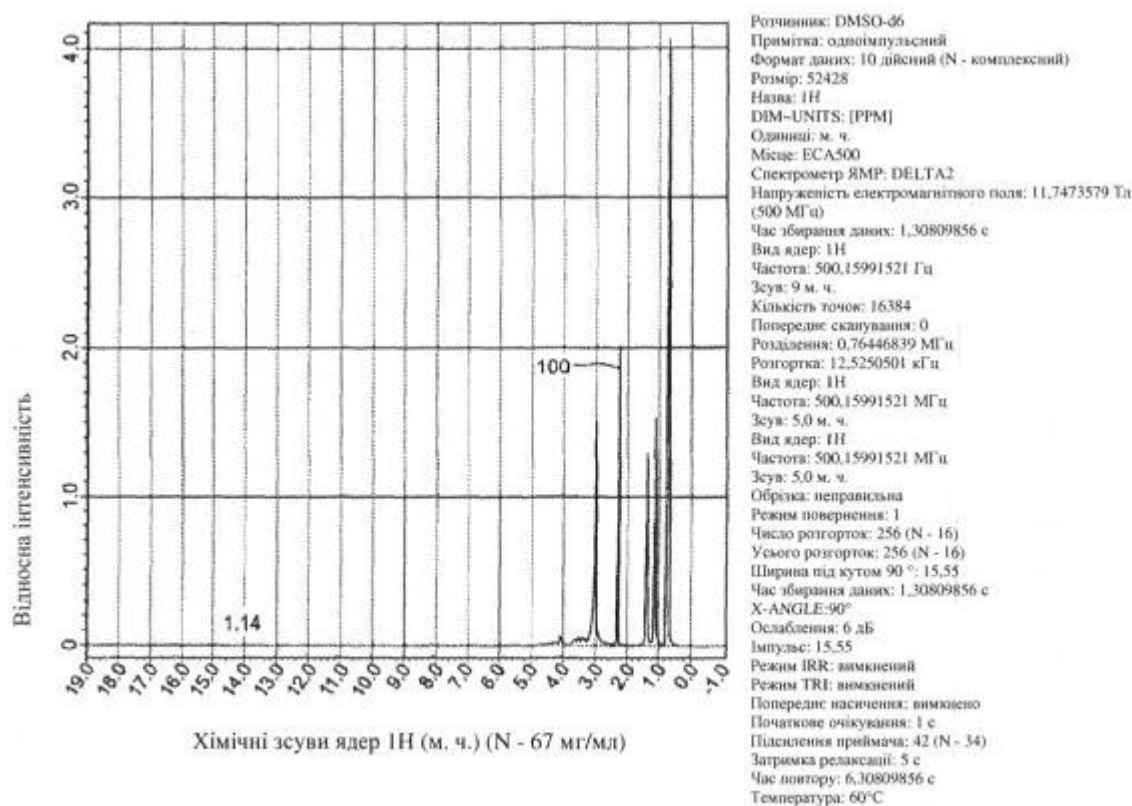
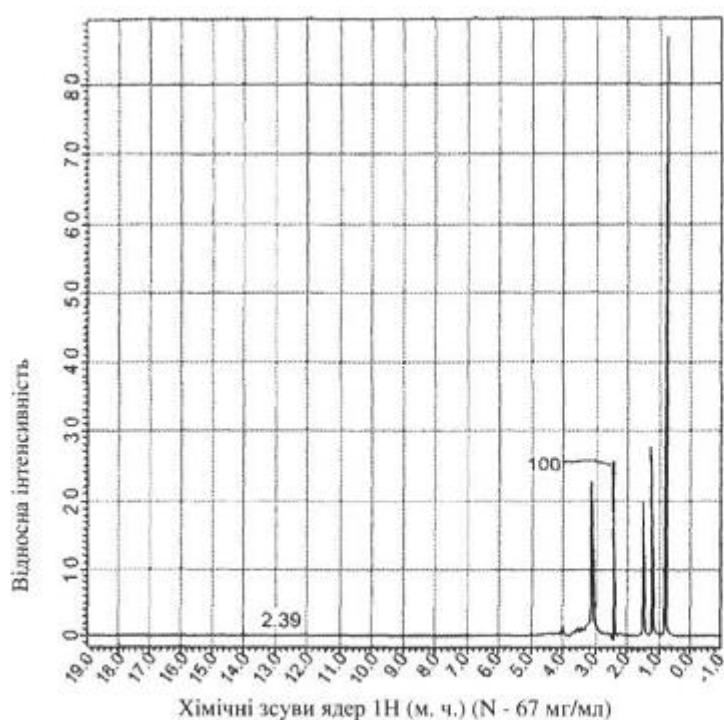
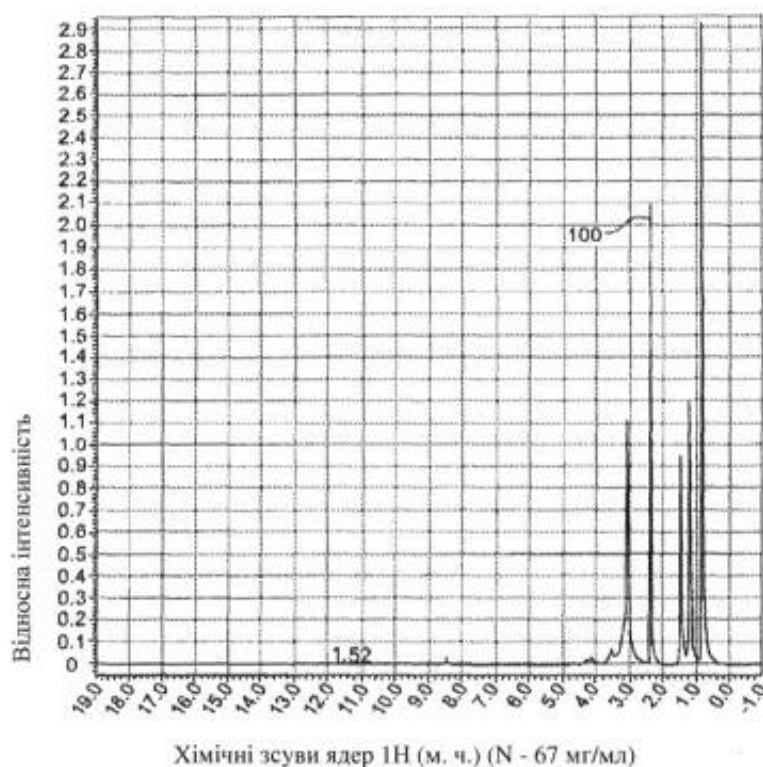


Fig. 5G



Розчинник: DMSO-d6
 Примітка: одновимірний
 Формат даних: 10 дійсний (N - комплексний)
 Розмір: 52428
 Назва: 1H
 DIM-UNITS: [PPM]
 Одиниці: м. ч.
 Місце: ECA500
 Спектрометр ЯМР: DELTA2
 Напруженість електромагнітного поля: 11,7473579 Тл (500 МГц)
 Час збирання даних: 1,30809856 с
 Вид ядер: ^1H
 Частота: 500,15991521 Гц
 Зсув: 9 м. ч.
 Кількість точок: 16384
 Попереднє сканування: 0
 Роздільність: 0,76446839 МГц
 Розгортка: 12,5250501 кГц
 Вид ядер: ^1H
 Частота: 500,15991521 МГц
 Зсув: 5,0 м. ч.
 Вид ядер: ^1H
 Частота: 500,15991521 МГц
 Зсув: 5,0 м. ч.
 Обрізка: неправильна
 Режим повернення: 1
 Число розгортки: 256 (N - 16)
 Усього розгортки: 256 (N - 16)
 Ширина під кутом 90° : 15,55
 Час збирання даних: 1,30809856 с
 X-ANGLE: 90°
 Ослаблення: 6 дБ
 Імпульс: 15,55
 Режим IRR: вимкнений
 Режим TRI: вимкнений
 Попереднє насичення: вимкнено
 Початкове очікування: 1 с
 Підсилення приймача: 42 (N - 34)
 Затримка релаксації: 5 с
 Час повтору: 6,30809856 с
 Температура: 60°C

Fig. 5H



Розчинник: DMSO-d6
 Примітка: одновимірний
 Формат даних: 10 дійсний (N - комплексний)
 Розмір: 52428
 Назва: 1H
 DIM-UNITS: [PPM]
 Одиниці: м. ч.
 Місце: ECA500
 Спектрометр ЯМР: DELTA2
 Напруженість електромагнітного поля: 11,7473579 Тл (500 МГц)
 Час збирання даних: 1,30809856 с
 Вид ядер: ^1H
 Частота: 500,15991521 Гц
 Зсув: 9 м. ч.
 Кількість точок: 16384
 Попереднє сканування: 0
 Роздільність: 0,76446839 МГц
 Розгортка: 12,5250501 кГц
 Вид ядер: ^1H
 Частота: 500,15991521 МГц
 Зсув: 5,0 м. ч.
 Вид ядер: ^1H
 Частота: 500,15991521 МГц
 Зсув: 5,0 м. ч.
 Обрізка: неправильна
 Режим повернення: 1
 Число розгортки: 256 (N - 16)
 Усього розгортки: 256 (N - 16)
 Ширина під кутом 90° : 15,55
 Час збирання даних: 1,30809856 с
 X-ANGLE: 90°
 Ослаблення: 6 дБ
 Імпульс: 15,55
 Режим IRR: вимкнений
 Режим TRI: вимкнений
 Попереднє насичення: вимкнено
 Початкове очікування: 1 с
 Підсилення приймача: 42 (N - 34)
 Затримка релаксації: 5 с
 Час повтору: 6,30809856 с
 Температура: 60°C

Fig. 5I

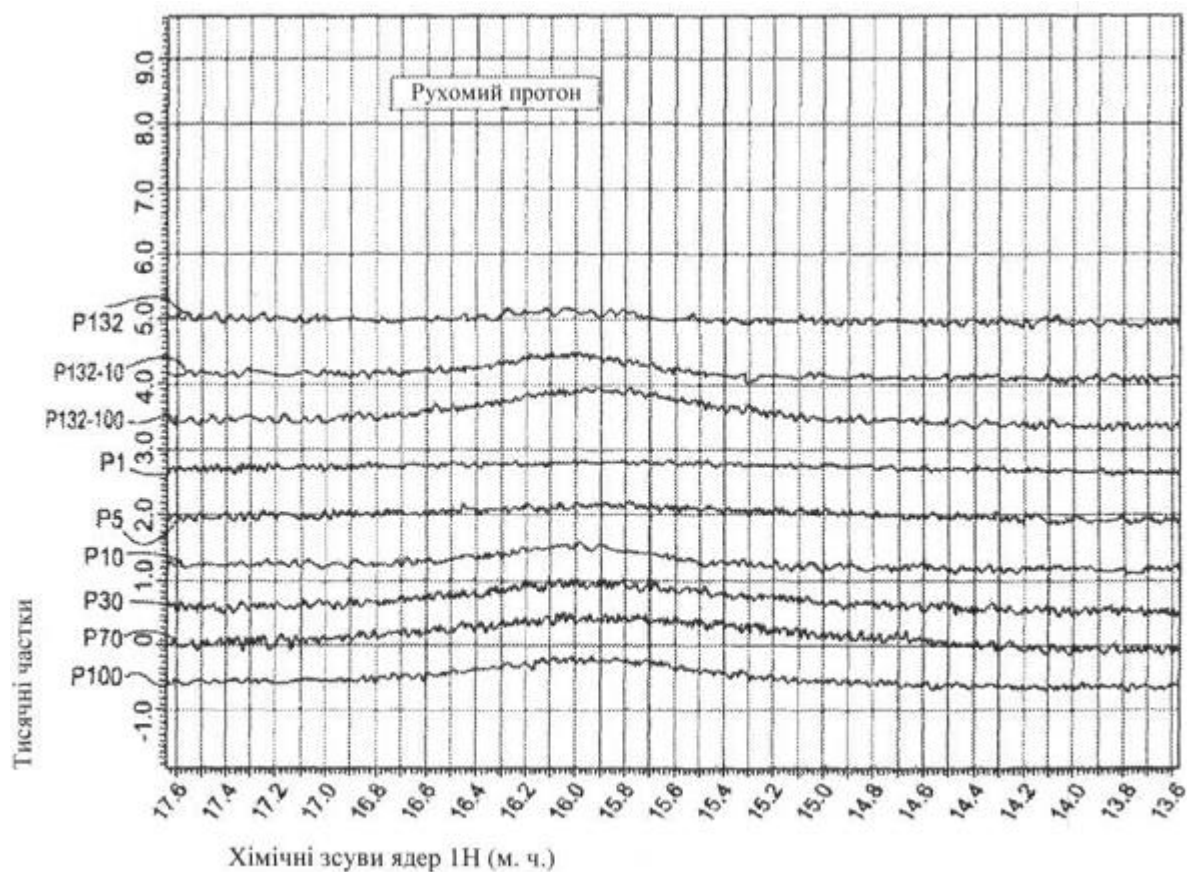


Fig. 5J

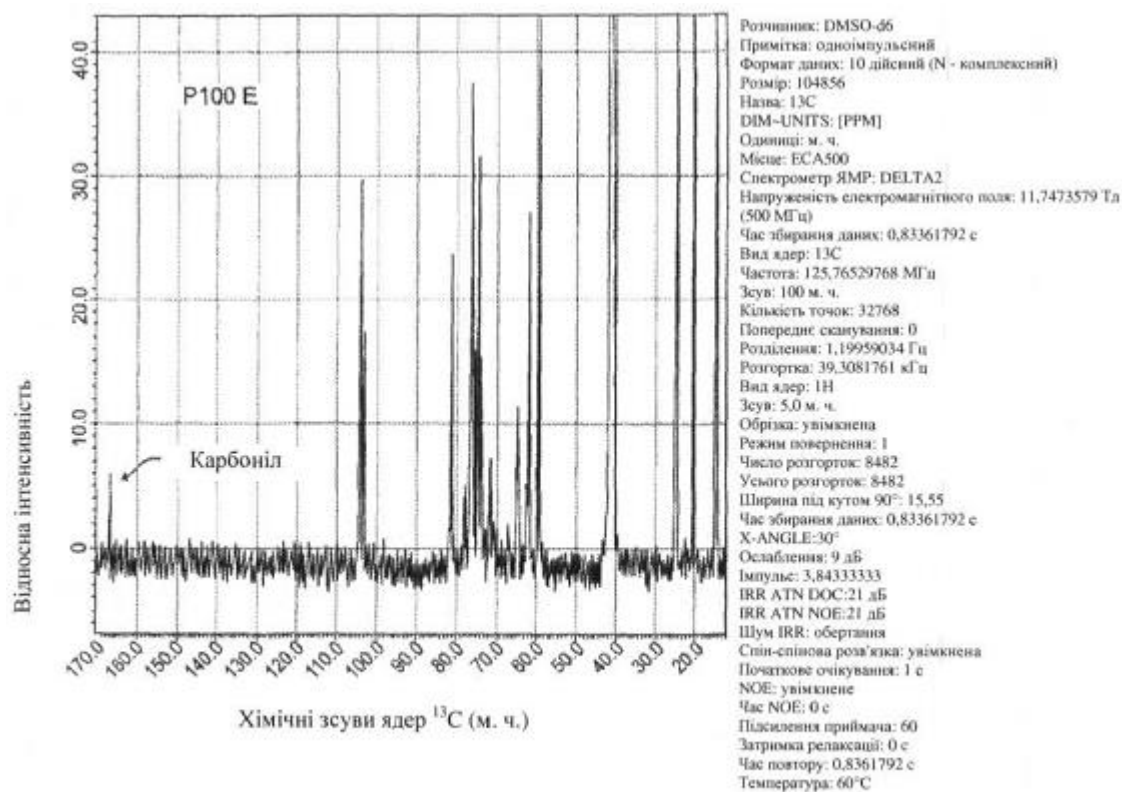
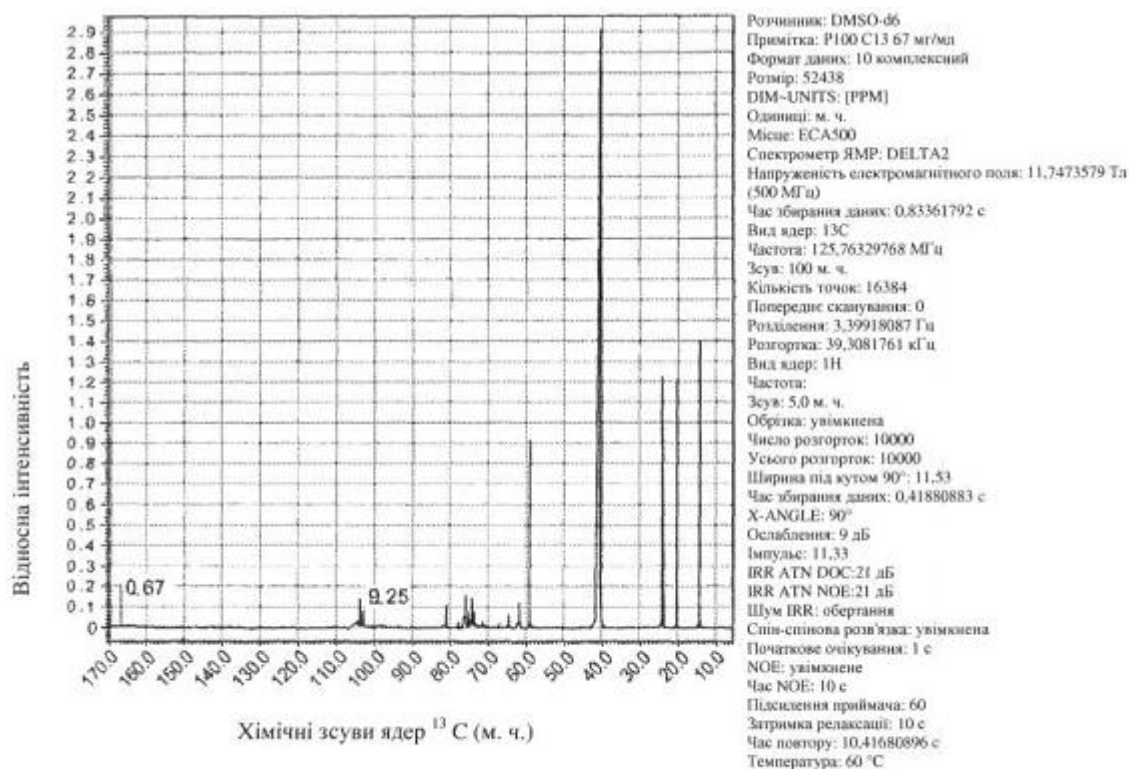
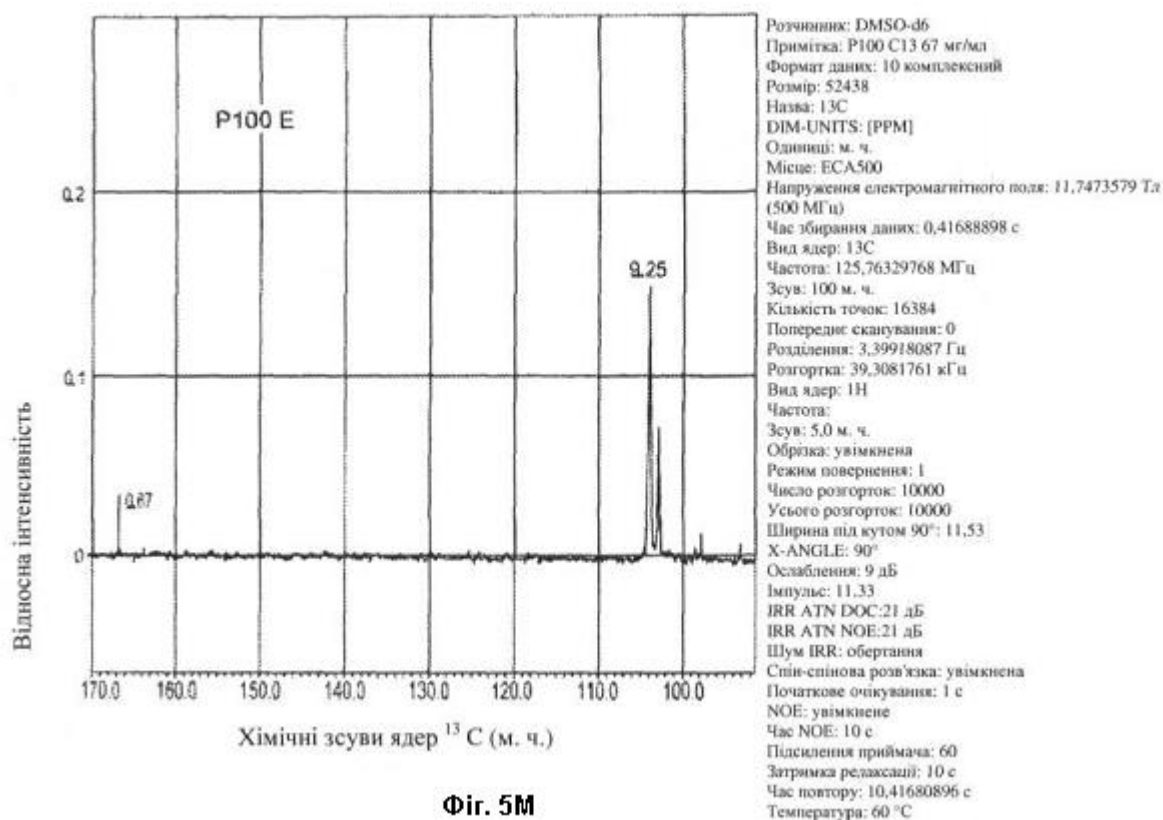


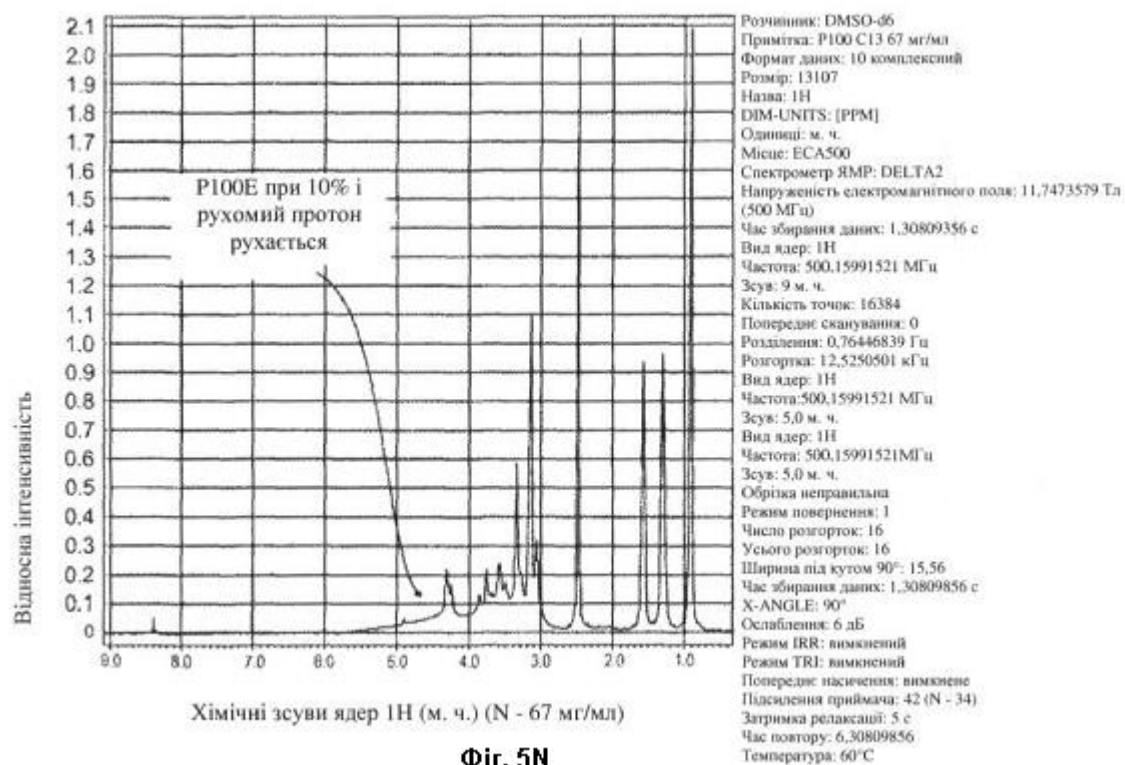
Fig. 5K



Фіг. 5L



Фіг. 5M



Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
 вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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