



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010144861/10, 03.04.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
03.04.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
03.04.2008 US 61/042,133

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2012 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 10.08.2014 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SUN XIAO-FENG ET AL., Comparative Study of Crude and Purified Cellulose from Wheat Straw, //Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, N52, p. 839-847. LEE JAE-WON ET AL., Biological Pretreatment of Softwood Pinus densiflora by Three White Rot Fungi, \ The Journal of Microbiology, December 2007. N.6 p.485-491. EA 6944 B1, 30.06.2006. RU 2158763 C2, 10.11.2000

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 03.11.2010

(86) Заявка РСТ:  
US 2009/039445 (03.04.2009)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2009/124240 (08.10.2009)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО  
"Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

АТАЛЛА Раджай Х. (US)

(73) Патентообладатель(и):

СЕЛЮЛОУЗ САЙЕНСИЗ  
ИНТЕРНЭШНЛ, ИНК. (US)

## (54) СПОСОБ ДЕЗАГРЕГИРОВАНИЯ И ДЕКРИСТАЛЛИЗАЦИИ ЦЕЛЛЮЛОЗНОГО МАТЕРИАЛА И ПРОДУКТ, ПОЛУЧЕННЫЙ УКАЗАННЫМ СПОСОБОМ

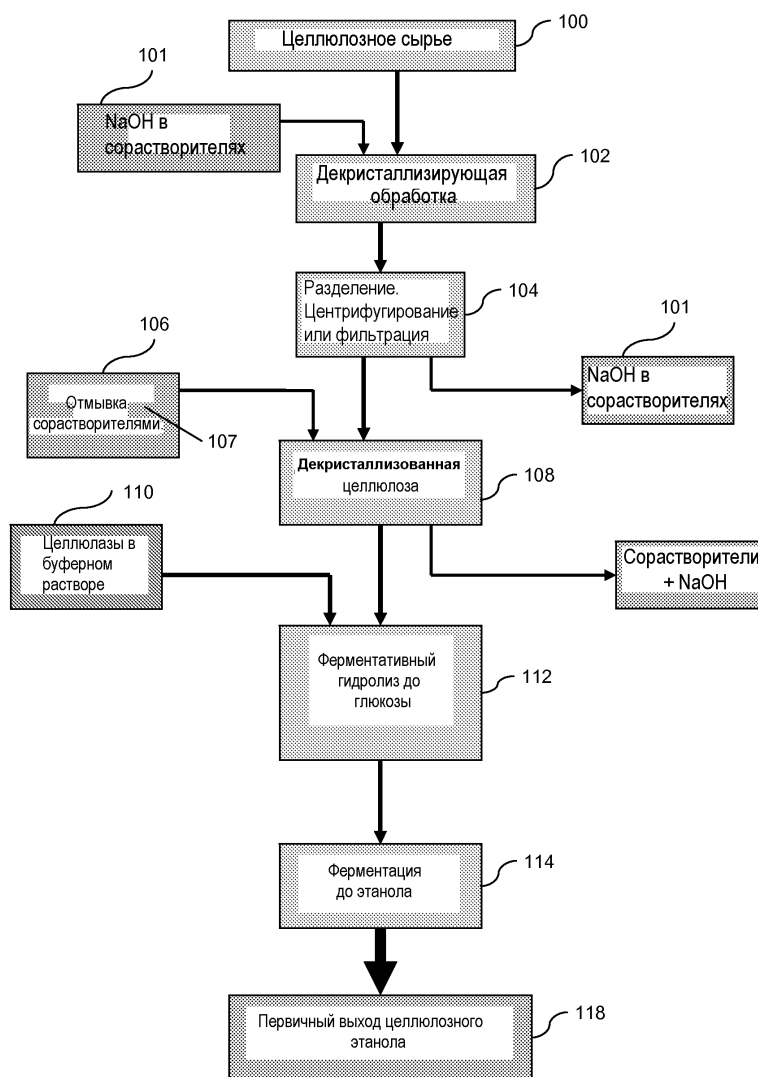
(57) Реферат:

Изобретения относятся к технологии обработки целлюлозы. Предложена группа изобретений: способ дезагрегирования и декристаллизации целлюлозного материала, продукт, полученный этим способом, набор для осуществления указанного способа, а также

способ получения биотоплива. Способ дезагрегирования и декристаллизации включает обработку целлюлозного материала щелочью с концентрацией более чем 1М в системе соразтворителей на основе воды и второго водорастворимого растворителя в соотношении

25:75. Водорастворимый растворитель является органическим полярным растворителем, в частности первичным, вторичным или третичным спиртом или полиолом. Осуществляют отмывку дезагрегированной и декристаллизованной целлюлозы соразводителем с получением целевого продукта. Набор для осуществления вышеуказанного включает щёлочь в системе соразводителей спирт/вода и инструкции для дезагрегирования и декристаллизации целлюлозы. Способ получения биотоплива включает ферментативный гидролиз целлюлозного материала целлюлазами в течение времени,

соответствующего первой фазе двухфазного ферментативного гидролиза. После этого проводят обработку остаточной целлюлозы, отмывку дезагрегированной и декристаллизованной целлюлозы соразводителем для удаления щёлочи. Затем осуществляют гидролиз дезагрегированной и декристаллизованной целлюлозы до глюкозы и целло-олигодекстринов. Предложенная группа изобретений обеспечивает улучшенную доступность целлюлозы для ферментативных модификаций. 4 н. и 6 з.п. ф-лы, 7 ил., 5 табл., 4 пр.



Фиг. 2

RU 2525140 C2

RU 2525140 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C08B* 1/00 (2006.01)  
*C12P* 7/06 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010144861/10, 03.04.2009**

(24) Effective date for property rights:  
**03.04.2009**

Priority:

(30) Convention priority:  
**03.04.2008 US 61/042,133**

(43) Application published: **10.05.2012** Bull. № 13

(45) Date of publication: **10.08.2014** Bull. № 22

(85) Commencement of national phase: **03.11.2010**

(86) PCT application:  
**US 2009/039445 (03.04.2009)**

(87) PCT publication:  
**WO 2009/124240 (08.10.2009)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO  
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",  
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):  
**ATALLA Radzhaj Kh. (US)**

(73) Proprietor(s):  
**SEL'JuLOUZ SAJENSIZ INTERNEhShNL,  
INK. (US)**

(54) **METHOD OF DISAGGREGATION AND DECRYSTALLISATION OF CELLULOSE MATERIAL AND PRODUCT, OBTAINED THEREOF**

(57) Abstract:

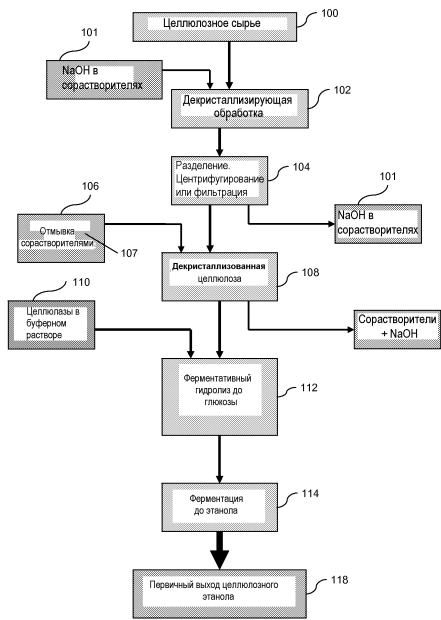
FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: inventions relate to cellulose processing technology. Claimed is group of inventions: method of disaggregation and decrystallisation of cellulose material, product obtained by said method, set for said method realisation, and method of obtaining biofuel. Method of disaggregation and decrystallisation includes processing cellulose material with alkali with concentration higher than 1M in system of co-solvents based on water and second water-soluble solvent in ratio 25: 75. Water-soluble solvent is an organic polar solvent, in particular, primary, secondary of tertiary alcohol or polyol. Washing of disaggregated and decrystallised cellulose is carried out with co-solvent with obtaining target product. Set for realisation of said method includes alkali in system of co-solvents alcohol/water and instructions for disaggregation and decrystallisation of cellulose. Method of obtaining biofuel includes fermentative hydrolysis of cellulose material with cellulases for the time, corresponding to the first phase of two-phase fermentative hydrolysis. After that processing of residual cellulose is carried out, disaggregated and decrystallised cellulose is washed with co-solvent to remove alkali. After that, hydrolysis of disaggregated and decrystallised cellulose to glucose and cello-oligodextrines is performed.

FIELD: chemistry.

EFFECT: claimed group of inventions provides improved availability of cellulose for fermentative modifications.

10 cl, 7 dwg, 5 tbl, 4 ex



ФИГ. 2

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США 61/042133, поданной 3 апреля 2008, на основании 35 U.S.C. § 119(e), полное раскрытие которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

### 5 ЗАЯВЛЕНИЕ, КАСАЮЩЕЕСЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ИЛИ РАЗРАБОТОК, ФИНАНСИРУЕМЫХ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА

Не применяется.

#### **ВВЕДЕНИЕ**

10 Целлюлоза является наиболее широко распространенным из всех встречающихся в природе полимеров. Химически - это полисахарид, состоящий из ангидроглюкозных остатков ( $\beta$ -D-глюкопиранозных колец), соединенных кислородными связями ( $\beta$ -1,4-глюкозидные связи), и имеет эмпирическую формулу  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Целлюлоза является наиболее характерным компонентом растительной клеточной стенки, поскольку она образует значительную часть структурного строения клеточной стенки. Она имеет  
15 линейную цепочечную структуру, которая образует кристаллические нанオフィбриллы, в которых множество параллельных  $\beta$ -1,4-глюкозидных цепей соединяются бок о бок и формируют наноразмерные микрофибриллы (диаметром 2-20 нм и длиной 100-40000 нм), которые имеют значительный предел прочности при растяжении и химическую стабильность и являются очень устойчивыми к разрушению, например к  
20 ферментативной, химической и механической деградации. Целлюлоза является нерастворимой в воде и простых органических растворителях. Она увеличивается в объеме в растворах гидроксида натрия и растворяется в реагенте Швайцера.

С коммерческой точки зрения целлюлоза используется для производства бумаги, 25 пластиков и текстильных материалов. Производные целлюлозы включают вискозное волокно, целлофан, загустители, используемые в пищевых продуктах и красках, и материалы для покрытий. Совсем недавно производство биологического топлива проявило большой интерес к целлюлозному сырьевому материалу для производства биотоплива, такого как спирты, например этанол или бутанол, посредством  
30 микробиологических процессов, также как и углеводов, посредством химической каталитической конверсии.

Привлекательность получения биотоплива из целлюлозного сырьевого материала, такого как сельскохозяйственные отходы, травы и древесные отходы, происходит из доступности больших количеств этих недорогих сырьевых материалов и  
35 целесообразности избежания сжигания или захоронения целлюлозных отходов производства. Некоторые целлюлозные сырьевые материалы, которые могут быть использованы для производства биотоплива, определенно включают: (1) сельскохозяйственные отходы, такие как кукурузная солома, пшеничная солома, солома ячменя, рисовая солома, солома овсяного зерна, шелуха овсяного зерна, солома канюла и солома сои; (2) травы, такие как просо, китайский тростник, спартина изящная и  
40 двукисточник тростниковидный; (3) древесные отходы, такие как древесина и опилки осины; и (4) остатки производства сахара, такие как выжимки и свекловичная пульпа.

Процесс преобразования целлюлозных волокон в биотопливо подразумевает: 1) высвобождение целлюлозы и хемицеллюлозы из лигнина или увеличение доступности целлюлозы и хемицеллюлозы в целлюлозном сырье для целлюлазных ферментов; и 2)  
45 деполимеризация или гидролиз хемицеллюлозных и целлюлозных углеводородных полимеров на свободные сахара. Для получения спиртов сахара затем ферментируются в спирт, например в этанол, и спирт выделяется, обычно путем дистилляции. Альтернативно, сахара могут быть конвертированы в углеводороды посредством

повторной каталитической реакции.

Однако, как указано выше, целлюлоза, содержащаяся в большинстве растительных материалов, не полностью преобразуется в сахара, и эта стадия представляет собой наибольшее затруднение при коммерциализации процессов получения биотоплива. Из-за кристаллической структуры целлюлозы ферментативное превращение в сахара, например, занимает значительное количество времени и требует больших количеств гидролитических ферментов, таких как целлюлазы. Таким же образом для получения химически-модифицированных производных целлюлозы целлюлоза должна быть доступной для реакционно-способных химических средств; это обычно требует высоких температур, давления, строгих химических условий и продолжительных периодов времени.

Первоначально представлялось, что эффективное превращение целлюлозы из целлюлозных материалов в сахара просто включает высвобождение целлюлозы и гемицеллюлозы из их комплекса с лигнином. Однако наиболее недавние процессы фокусируются на увеличении доступности целлюлозы в лигноцеллюлозной биомассе с последующей деполимеризацией или гидролизом целлюлозных углеводородных полимеров на сахара. Увеличение доступности целлюлозы наиболее часто достигается предварительной обработкой целлюлозного субстрата.

Целью большинства способов предварительной обработки является обеспечение достаточной комбинации механических и механических действий, с тем, чтобы разрушить волокнистую структуру и увеличить доступность сырья для гидролитических ферментов, таких как целлюлазы, которые могут гидролизовать целлюлозу. Механические действия обычно включают использование давления, измельчение, перемалывание, встряхивание, дробление, сжатие/растяжение или другие типы механических действий. Химические действия обычно включают использование тепла (часто пара), кислот и органических растворителей.

Даже при использовании наиболее эффективных из известных в настоящее время процессов предварительной обработки количество гидролитических ферментов, необходимое для превращения целлюлозы в сахара, остается высоким и представляет собой значительную часть стоимости производства биотоплива. Так, эффективное превращение целлюлозы из целлюлозных материалов в сахара и, например, последовательная ферментация сахаров в спирт, такой как этанол, представляет собой основное препятствие для коммерческой рентабельности. Увеличение времени гидролиза в целях избежания высокой стоимости увеличения дозировки ферментов требует больших реакторов, что, в свою очередь, увеличивает стоимость оборудования. Перемешивание и прерывистое перемешивание сырья в процессе гидролиза может увеличить эффективность ферментов, но стоимость оборудования опять же возрастает, и увеличивающаяся сила трения может вызвать ферментативную денатурацию. Еще другие системы не включают оптимальную ферментативную активность и снижают эффективность ферментов.

Более того, трудность с превращением целлюлозы в получение с высокой добавленной стоимостью затрагивает не только получение биотоплива. Как указано, целлюлозные производные включают волокна и пластики, например, регенерированные целлюлозы, такие как искусственный шелк и целлофан, целлюлозные эфиры, такие как ацетатный, маслянокислый, триацетатный и смешанные эфиры, нитрат целлюлозы, вискоза и лиоцелл (Tencel).

Некоторые из целлюлозных кристаллических доменов являются так плотно агрегированными, что химические реагенты не могут полностью в них проникнуть,

сходно с недостатком доступа для ферментов для полного гидролиза. Результатом является то, что степень замещения по направлению цепей целлюлозы в целлюлозных производных может быть весьма нерегулярной, что приводит к проблемам контроля качества.

## 5 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

В соответствии с принципами, явно показанными в вариантах осуществления изобретения, предоставлены способы и системы, которые дезагрегируют или декристаллизуют целлюлозу таким образом, что она становится более доступной для ферментативных или химических модификаций, например реакций деполимеризации или гидролиза. Способы и системы, в действительности, усиливают преобразование сырья на основе целлюлозы для применения получения биотоплива и целлюлозных производных.

Способы и системы в настоящем описании включают обработку целлюлозного сырья раствором щелочи в системе соразтворителей, включающей воду и второй растворитель, который является полярным и полностью водорастворимым, для получения декристаллизованной целлюлозы, и стабилизирование декристаллизованной целлюлозы путем отмывки щелочи до достижения декристаллизованной целлюлозы в водной среде. Отмывка может быть выполнена в системе соразтворителей, которая является той же самой, что и на стадии обработки, с различными соотношениями воды и второго растворителя. Среди наиболее эффективных соразтворителей, идентифицированных до сих пор, присутствуют спирты. В вариантах осуществления изобретения этот процесс проводится при мягких условиях температуры и давления.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Изобретение может быть лучше понято и оценено путем ссылки на детальное описание определенных вариантов осуществления, представленных в настоящем описании, в сочетании с сопутствующими им чертежами:

Фиг.1 является рентгеновской дифрактограммой древесной массы перед и после процесса предварительной обработки в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения;

30 Фиг.2 является блок-схемой, иллюстрирующей систему в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, включающую предварительную обработку целлюлозного сырья для увеличения доступности для деполимеризации;

Фиг.3 показывает сравнительные рентгеновские дифрактограммы целлюлозы, выделенной при 70°C, перед и после того, как она была прокалена при 150°C;

35 Фиг.4 является графиком размера полувысоты целлюлозных образцов, прокаленных при различных температурах;

Фиг.5 является блок-схемой, описывающей вариант осуществления, в котором ферменты применены без предварительной обработки с последующим отделением остаточной целлюлозы, предварительной обработкой в соответствии с изобретением; 40 и затем рекомбинации с супернатантом после первой стадии;

Фиг.6 является блок-схемой, иллюстрирующей альтернативный вариант осуществления для уменьшения времени ферментативной реакции в соответствии с принципами настоящего изобретения, включая обработку остаточной целлюлозы из первой стадии предварительной обработки во второй стадии декристаллизации и ферментативного гидролиза до глюкозы перед ферментацией в этанол;

Фиг.7 является блок-схемой, иллюстрирующей еще один вариант осуществления для уменьшения времени ферментативной реакции в соответствии с принципами настоящего изобретения, использующий противоточную систему, где остаточная целлюлоза из

вторых стадий обработки повторно используется в первой стадии предварительной обработки.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Предоставлены способы и системы, воплощающие принципы изобретения, в которых  
5 целлюлозные материалы декристаллизованы или дезагрегированы путем обработки, которая включает контактирование целлюлозного материала со щелочью в системе соразтворителей, которая содержит воду и водорастворимый растворитель, например спирт или полиол. Декристаллизованная целлюлоза является более доступной для ферментативных или химических реакций. Таким образом, способы и системы в  
10 соответствии с вариантами осуществления изобретения увеличивают эффективность ферментативных или химических модификаций целлюлозы для применения в качестве биотоплива или целлюлозных производных.

Однако перед детальным объяснением какого-либо варианта осуществления следует понимать, что применение изобретения не ограничивается деталями конструкции и  
15 расположением компонентов, представленных в нижеследующем описании, проиллюстрированных на чертежах или приведенных в качестве примера в Примерах. Такие описания, чертежи и примеры не подразумеваются как ограничивающие рамки изобретения, как представлено в прилагающейся Формуле изобретения. Изобретение допускает другие варианты осуществления и может практиковаться или осуществляться  
20 различными путями.

Более того, не допускается, что какая-либо ссылка, включающая какой-либо патент или патентный документ, процитированный в настоящей спецификации, устанавливает известный уровень техники. В частности, должно быть понятно, если не утверждается обратное, что ссылка на какой-либо документ в настоящем описании не допускает  
25 того, что какой-либо из настоящих документов составляет часть общеизвестных знаний в области техники в Соединенных Штатах или в любой другой стране. Любое обсуждение ссылок констатирует то, что их авторы утверждают, и заявитель оставляет право за собой оспаривать точность и уместность любого процитированного в настоящем описании документа.

На всем протяжении настоящего раскрытия различные стороны настоящего изобретения могут быть представлены в различном формате. Должно быть понятно, что описание в различном формате представлено лишь для удобства и краткости и не должно быть истолковано как негибкое ограничение объема изобретения. Соответственно, специалисту в области техники должно быть понятно, для всех и  
35 любых целей, особенно в контексте предоставления письменного описания, все диапазоны, описанные в настоящем описании, также охватывают все и любые возможные поддиапазоны и их комбинации, также как и все интегральные и дробные численные значения внутри этого диапазона. В качестве только примера, диапазон от 20% до 40% может быть разделен на диапазоны от 20% до 32,5% и от 32,5% до 40%, от  
40 20% до 27,5% и от 27,5% до 40% и так далее. Любые перечисленные диапазоны также легко принимаются как достаточно описывающие и делающие возможным этот же диапазон разделить на, по меньшей мере, одинаковые половины, трети, четверти, пятые части, десятые части и так далее. В качестве неограничивающего примера каждый обсужденный в настоящем описании диапазон может быть легко разделен на нижнюю  
45 треть, среднюю треть и верхнюю треть и т.д. Более того, также должно быть понятно специалисту в области техники, что все выражения, такие как «до», «по меньшей мере», «более чем» и тому подобные включают указанные числа и относятся к диапазонам, которые могут быть последовательно разделены на поддиапазоны, как обсуждалось



выше. Таким же образом все диапазоны, описанные в настоящем описании, также включают все субдиапазоны, попадающие в более широкий диапазон. Более того, фразы «находящийся/находится между» первым обозначенным числом и вторым обозначенным числом и «находящийся/находится от» первого обозначенного числа «до» второго обозначенного числа используются взаимозаменяемо. Вышеприведенное является только примерами того, что в конкретном случае имелось в виду.

Также, должно быть понятно, что использованная в настоящем описании фразеология и терминология приведена в целях описания и не должна восприниматься как ограничивающая. Использование «включающий», «состоящий», «имеющий» и их вариаций в настоящем описании направлено на охват перечисленных ниже предметов и их эквивалентов, а также и дополнительных предметов. «Включающий» включает в себе термины «состоящий из» и «состоящий в основном из». Использование «состоящий в основном из» означает, что композиция или способ может включать дополнительные ингредиенты и/или стадии, но только если дополнительные ингредиенты и/или стадии не существенно изменяют основные и новаторские характеристики заявленной композиции или способа. Если не обозначено или не ограничено иначе, термины, такие как «смонтирован», «связан», «подкреплен» и «соединен» и их варианты использованы широко и охватывают как прямое, так и не прямое монтирование, связывание, подкрепление и соединение. Кроме того, «связан» и «соединен» не ограничиваются лишь физическими или механическими связями или соединениями.

Если не указано иначе, технические термины используются в соответствии с общепринятым использованием. Однако, как используется в настоящем описании, нижеследующие определения могут быть полезны в содействии квалифицированному практику в понимании изобретения.

Используемые в настоящем описании термины «целлюлозное сырье», «целлюлозный субстрат» или «целлюлозный материал» направлены для указания любого типа биомассы, которая содержит целлюлозу. Например, целлюлозное сырье может включать травы, такие как просо, спартина изящная, райграс, китайский тростник или их комбинации; остатки процессирования сахара, такие как выжимки сахарного тростника и жим свекловичной пульпы; сельскохозяйственные отходы, такие как солома соевых бобов, кукурузная солома, солома овсяного зерна, рисовая солома, рисовая шелуха, солома ячменя, стержень кукурузного початка, пшеничная солома, солома канола, шелуха овсяного зерна и кукурузное волокно; и древесные отходы, такие как волокно повторно переработанной древесной массы, древесные опилки, твердая древесина, мягкая древесина или любые их комбинации. Кроме того, целлюлозное сырье может включать целлюлозные отходы или древесные отходы производства, такие как газетная бумага, картон и тому подобное. Целлюлозное сырье может также включать один или более видов волокон, которые происходят из различного целлюлозного сырья. Пшеничная солома, солома ячменя, кукурузная солома, солома соевых бобов, солома канолы, просо, двукисточник тростниковидный, выжимки сахарного тростника, спартина изящная, шелуха овсяного зерна, свекловичная пульпа и китайский тростник являются особенно предпочтительными в качестве целлюлозного сырья из-за их широкого распространения и низкой стоимости.

Подразумевается, что термин «гидролитический(ие) фермент(ы)» относится к ферментам, которые катализируют гидролиз биологических материалов, таких как целлюлоза. Гидролитические ферменты включают «целлюлазные ферменты» или «целлюлазы» (используются взаимозаменяемо), которые являются ферментами, катализирующие гидролиз целлюлозы до продуктов, таких как глюкоза, целлобиоза,

целло-олигодекстринов, и другие целло-олигосахариды. «Целлюлаза» подразумевается как общий термин, означающий многоферментный комплекс или семейство, включающее экзо-целлобиогидролазы (СВН), эндоглюканазы (ЕГ) и  $\beta$ - глюкозидазы ( $\beta$ G), которое может продуцироваться многими растениями и микроорганизмами.

5 Указано, что многие неочищенные экстракты также содержат некоторые гемицеллюлазы. Процесс в соответствии с вариантами осуществления изобретения может быть реализован с любым типом комплекса целлюлазных ферментов, вне зависимости от их источника; однако микробные целлюлазы обычно доступны по более низкой цене, чем целлюлазы из растений. Среди наиболее хорошо изученных  
10 охарактеризованные и коммерчески продуцируемые целлюлазы присутствуют, например, полученные из грибов рода *Aspergillus*, *Humicola* и *Trichoderma*, и из бактерий рода *Bacillus* и *Thermobifida*. Также, например, целлюлаза, продуцируемая нитчатый грибом *Trichoderma longibrachiatum*, содержит, по меньшей мере, два целлобиогидролазных фермента, названные СВН I и СВН II, и, по меньшей мере, 4 фермента ЕГ.

15 «Ферментационные ферменты» относится к ферментам, которые могут катализировать превращение целлюлозных сахаров в спирты, включая этанол, также как и спирты с более длинной цепью, такие как бутанол. В основном, дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae*, используются для получения ферментов, которые катализируют превращение. Ферменты могут также включать бактериальные ферменты  
20 из *Clostridium acetobutylicum*, также как и ферменты, продуцируемые сконструированными микроорганизмами, для получения спиртов с более длинной цепью из сахаров целлюлозы.

Термин «степень полимеризации» (аббревиатура D.P.) относится к количеству D-глюкозных мономеров в целлюлозной молекуле. Так, термин «средняя степень  
25 полимеризации» или «среднее D.P.» относится к среднему количеству молекул D-глюкозы на целлюлозный полимер в популяции целлюлозных полимеров.

Как используется в настоящем описании, термины «обработка», «обработывание», «предварительная обработка» или «предварительное обработывание» в отношении целлюлозы означают процесс или обработку в соответствии с вариантами осуществления  
30 изобретения, в которых целлюлоза делается более доступной для ферментативной или химической, например, химической каталитической реакции.

«Модификация или деградация» в отношении целлюлозы используется при упоминании биологического, например ферментативного или химически-индуцированного, изменения нативной структуры целлюлозы. Такие изменения и  
35 перестройки известны специалисту в области техники и включают те, что вовлечены в ферментативную деградацию и/или ферментативный или химический гидролиз целлюлозы, также как и химические модификации, вовлеченные в разнообразие коммерческие продукты на основе целлюлозы, получение спиртов путем ферментации биомассы и производство биотоплива, богатого водородом.

40 Термин «стабильная» или «стабилизирование» в отношении декристаллизованной целлюлозы указывает на декристаллизованную целлюлозу, которая не изменяется существенно в течение выбранного периода времени и при выбранных условиях.

Принимая во внимание вышеприведенные отрицательные свойства, характерные для традиционного превращения целлюлозы, варианты осуществления изобретения  
45 предоставляют новые способы для декристаллизации или дезагрегации целлюлозы. Способы включают реакцию целлюлозы с раствором для обработки, который содержит щелочь, растворенную в системе соразтворителей, при мягких условиях температуры и давления, которые могут быть оптимизированы для экономической рентабельности.

Подвержение целлюлозы такой обработке в соответствии с вариантами осуществления изобретения делает целлюлозу более доступной для ферментативных или химических реакций путем открытия в плотную агрегированных доменов, которые являются также причиной неподатливости в течение гидролиза. Результирующая декристаллизованная целлюлоза в соответствии с вариантами осуществления изобретения также обеспечивает гораздо большее единообразие замещения вдоль целлюлозных цепей, минимизируя проблемы, связанные с контролем качества, которые в настоящее время имеют место при анализе продуктов из производных целлюлозы. Обратимся к Фиг.1, которая показывает рентгеновскую дифрактограмму волокнистой массы перед и после обработки в соответствии с вариантами изобретения, показывающей декристаллизацию волокнистой массы.

Существует множество систем растворителей, которые могут размачивать природные целлюлозы без их растворения. С процессом, в соответствии с вариантами осуществления изобретения, который делает доступным семикристаллические целлюлозные домены, представляется возможным, что некоторые системы, которые размачивают целлюлозу, могут быть использованы для ее растворения и, таким образом, делают возможным регенерацию целлюлозы в экономически конкурентных процессах.

Как описано выше, раствор для обработки в соответствии с вариантами осуществления изобретения содержит щелочь, растворенную в системе соразтворителей. Соответственно, щелочь растворена в системе соразтворителей, состоящей из воды плюс второй водорастворимый растворитель. С одной стороны, в качестве второго растворителя является подходящим спирт, который может быть, например, метанолом, этанолом, пропанолом, изопропанолом, бутанолом, изобутанолом или полиолом. С другой стороны, второй растворитель может включать другие протонные растворители, также как и непротонные растворители, которые растворимы в воде. В показанном варианте осуществления система соразтворителей является этанолом и водой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения щелочью является гидроксид натрия (NaOH), хотя другие щелочи также могут быть использованы, такие как гидроксид лития (LiOH) или гидроксид калия (KOH). Концентрация NaOH, необходимая для раствора для обработки, зависит от природы целлюлозы, подлежащей обработке, поскольку пространственные решетки различных целлюлоз могут разрушаться при различных концентрациях щелочи. Например, пороговая величина для мерсеризации большинства волокнистых масс приблизительно 8% NaOH в воде; для хлопка она составляет приблизительно 11-12%, в зависимости от предшествующей предварительной обработки; и для бактериальной целлюлозы она составляет приблизительно 14%.

Установление молярности NaOH в растворе для обработки является итеративным процессом. В качестве начальной точки соотношение соразтворителей фиксируется на уровне, который найден как оптимальный для обработки хлопка (4), который по сообщению составляет 75% этанола и 25% воды. Молярность затем варьируется и эффективность обработки определяется до идентификации оптимальной молярности NaOH в соразтворителях.

В Примерах, указанных ниже, эффект растворов на Avicel, микрокристаллической целлюлозе, приготовленной из северной древесины мягких пород (American Viscose Company, Marcus Hook, PA) и превращенной в волокнистую массу при 180°C, был сравнен с более ранними наблюдениями для других целлюлоз. Было найдено, что работает хорошо молярность NaOH растворов между 1 М и 2 М. Avicel была выбрана для тестирования, потому что она стала стандартным субстратом, используемым в большинстве опубликованных исследований биопревращения целлюлозы. Avicel является

чрезвычайно не поддающейся воздействию целлюлозой и типичным представителем влияния повышенной температуры на степень кристаллизации волокнистой массы. В дополнительных Примерах была использована крафт-целлюлоза, полученная из туалетной бумаги. Туалетная бумага была типичным образцом, разработанным для использования в септических системах, таким образом, она не содержит добавок, увеличивающих влагостойкость. Бумага была сделана из приблизительно 65% древесины эвкалипта и 35% древесины северных хвойных пород. Использование органически растворимой волокнистой массы (например, см. U.S. Patent No. 4100016, Diebold, et al.) также включено в Примеры, указанные ниже.

Когда примерный оптимум молярности NaOH определен, определяется оптимальное соотношение соразтворителей. Когда 75% было выбрано более ранними исследователями, они не проверили потенциал 70% или 80%. В варьировании соотношения важно избегать уровней этанола, которые могут вызвать выпадение NaOH в осадок.

Теперь обратимся к Фиг.2, которая иллюстрирует общий процесс обработки для вариантов осуществления в соответствии с изобретением, так же, как и дополнительные стадии в процессировании целлюлозного сырья в спирт, например в этанол. Процесс начинается на стадии 100 с источником целлюлозы. В проиллюстрированном варианте осуществления на стадии 100 в качестве источника целлюлозы была использована Avicel.

На стадии 102 целлюлозный материал подвергается стадии предварительной обработки в соответствии с вариантом осуществления изобретения, а именно обработке раствором щелочи в системе соразтворителей 101, состоящей из воды и второго растворителя, такого как спирт, например этанол, или другого водорастворимого растворителя для декристаллизации целлюлозы. На стадии 104 реакционная смесь разделяется для получения декристаллизованной целлюлозы 108 и удаления раствора для обработки 101. На стадии 106 обработанная целлюлоза отмывается раствором соразтворителей для отмывки или смесью 107 для удаления щелочи. В качестве соразтворителей для отмывки или смеси подходит смесь спирт/вода. На стадии 112 обработанная целлюлоза в соответствии с вариантом осуществления изобретения гидролизует, например, путем обработки целлюлазами 110 для получения сахаров. На стадии 114 сахара, которые включают глюкозу и целло-олигодекстрины, подходящим образом ферментируются, и целлюлозный спирт 118 выделяется из реакционной смеси путем ферментации или другого метода выделения, например посредством мембранной сепарации.

Эффективность раствора для обработки соответственно измеряется появлением нарушений в спектре рамановского рассеяния целлюлозы, особенно в области низких частот между  $250\text{ см}^{-1}$  и  $600\text{ см}^{-1}$ , тогда как полоса при  $378\text{ см}^{-1}$  является очень чувствительным индексом уровня нарушений в природной пространственной решетке.

В отношении смеси для отмывки 107, если метанол был использован в качестве соразтворителя с водой, было найдено, что то же самое соотношение метанола к воде, как в системе соразтворителей для обработки, является подходящим для вымывания NaOH из целлюлозы. Для системы этанол/вода подходящее соотношение также является тем же самым, что и для соразтворителей для обработки.

Как было замечено ранее, работа с метанолом была основана на использовании того же самого соотношения соразтворителей, как и в предварительной обработке, и была использована в качестве стартовой точки для соразтворителей спирт/вода. Был определен эффект варьирования первоначального соразтворителя для первой отмывки.

С точки зрения перспектив процесса, является особенно удобным, если соотношение соразтворителей в отмывочной смеси выше по этанолу, чем то, которое используется для предварительной обработки, поскольку это снизит стоимость последующей обработки отмывочного раствора. Однако должно быть опять замечено, что

5 необходимо обеспечивать, чтобы содержание этанола в первоначальной отмывке не было таким высоким, чтобы вызвать выпадение NaOH в осадок.

После завершения первой отмывки необходимо продолжить отмывку целлюлозного субстрата до того, как будет достигнут нейтральный pH. Было найдено, что в некоторых случаях является более эффективным перенос из первой отмывки в отмывки с

10 соразтворителями, содержащими более высокие уровни воды, перед возможной отмывкой только водой.

Также было найдено, что степень сильной агрегации целлюлозы и, таким образом, устойчивость к воздействию, связана с наибольшей температурой, которой была подвергнута целлюлоза в процессе выделения (5). См. Фиг. 3 и 4, взятые из ссылки

15 Atalla et al. (5). Фиг.3 показывает значительное снижение в ширине на полувысоте пиков первичной дифракции природной целлюлозы как результат прокаливании при 150°C. Ширина на полувысоте для наиболее заметного отображения в рисунках порошковой дифракции древесных целлюлоз всегда рассматривалась как один из наиболее чувствительных показателей степени когерентности упорядоченности в целлюлозе в

20 стенках древесных клеток. Фиг.4 показывает, как ширина на полувысоте становится меньше при снижении температуры обработки. Так, в сущности, устойчивость к воздействию целлюлозного образца напрямую коррелирует с температурой выделения.

После обработки и отмывки может быть определена степень, на которой обработанная целлюлоза стала более доступной, т.е. декристаллизованной. Простые

25 аналитические способы, такие как потеря веса при ферментативном гидролизе, могут быть использованы для измерения успешности декристаллизации целлюлозы. Способы, использующие доступность декристаллизованной целлюлозы для оксида дейтерия (D<sub>2</sub>O), также могут быть использованы. Поскольку эти способы классифицируют обработки, то легкость, с которой происходит обмен водорода с дейтерием, показывает,

30 что использование D<sub>2</sub>O может приводить к завышенной оценке доступности. Было найдено, что дейтерированный этиленгликоль (ОНCD<sub>2</sub>CD<sub>2</sub>ОН) должным образом определяет степень доступности ферментативного действия.

При использовании дейтерированных способов наиболее распространенные

35 измерения доступности основаны на наблюдении доступа к целлюлозным гидроксильным группам на основе перфузии образцов D<sub>2</sub>O (4). Хотя это и является успешным измерением, более надежные измерения основаны на доступности для молекул большего размера, чем D<sup>+</sup> ион. Такие подходящие молекулы включают пердейтероэтанол (CD<sub>3</sub>ОН), пердейтероэтиленгликоль (CD<sub>2</sub>ОНCD<sub>2</sub>ОН) и

40 пердейтероглицерол (CD<sub>2</sub>ОНCDОНCD<sub>2</sub>ОН), которые могут быть добавлены к предварительно обработанным целлюлозным образцам в растворе в H<sub>2</sub>O и оставлены для достижения равновесия. Количество дейтерированных молекул в целлюлозных образцах определяется посредством измерения рамановского спектра образцов в

45 области между 2300 и 2700 см<sup>-1</sup>, где не будет интерференции от каких-либо других функциональных групп. Приготовление пердейтерированных образцов спиртов или полиолов может быть выполнено перегонкой с обратным холодильником в D<sub>2</sub>O над скелетным никелевым катализатором гидрирования.

Пердейтерированный метанол коммерчески доступен, и пердейтерирование гликоля или глицерола может быть осуществлено, как описано выше. Пердейтерированный метанол используется в измерениях, основанных на использовании других целлюлоз, которые являются обычными стандартами, таких как Avicel, которая получена из  
5 растворения волокнистой массы, и порошок Whatman CF-1, который получен из хлопкового короткого волокна. Эти стандарты предварительно смачивали, используя известные методики.

Поскольку большинство ферментов гораздо больше по размеру, чем молекулы, используемые для оценки доступности целлюлозы, был разработан тест для  
10 трансформации целлюлоз, наиболее сопоставимый с активностью ферментов. В этом тесте предварительно обработанная и отмытая целлюлоза инкубируется с типичными целлюлазами из *Aspergillus niger* и *Trichoderma reesi* для определения эффекта трансформации на подверженность действию ферментов. Как замечено ранее, увеличенная доступность целлюлоз для гидролитических ферментов должна увеличивать  
15 степень превращения в сахара, по меньшей мере, на один порядок или более.

Снова сошлемся на Фиг.2, где отмечено, что часть продуцированного спирта, например этанола, а именно номер позиции 118, может быть использована на стадии декристаллизации 102 в качестве соразтворителя. Так, в соответствии с вариантами осуществления изобретения, полный процесс превращения целлюлозы может иметь  
20 удобную петлю обратной связи для поставки соразтворителя для процесса предварительной обработки.

Отмечено, что препятствием к экономическому внедрению ферментативного гидролиза целлюлоз является двухфазная природа процесса, когда целлюлозы подвергаются действию гидролитических ферментов на постоянной основе в  
25 периодическом процессе. Очень длительное время обработки, требующееся для второй фазы, приводит к необходимости в очень больших накопительных емкостях для удовлетворения требования времени, необходимого для завершения второй фазы. В другом варианте осуществления представляется, что длительное время обработки в реакциях ферментативного гидролиза из-за его двухфазной природы может быть  
30 снижено путем применения процессов обработки в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Для преодоления этого препятствия применение ферментов может быть подходящим образом выполнено во множественных стадиях, с обработкой целлюлозных субстратов в соответствии с вариантами осуществления изобретения между стадиями.

По крайней мере, три таких многостадийных процесса рассмотрены. Как показано на Фиг.5, первое применение ферментативного гидролиза осуществлено на первой  
35 стадии перед предварительной обработкой, как описано в настоящем описании, чтобы использовать преимущество относительно быстрой ранней фазы ферментативного гидролиза. Когда уровень гидролиза снизился в начале второй фазы, твердый целлюлозный остаток был отделен и подвергнут предварительной обработке, как  
40 описано в настоящем описании, и затем снова объединен с супернатантной жидкой фракцией, отделенной от твердого вещества в конце первой стадии. Конкретно, целлюлозный материал 100 подвергнут ферментативному гидролизу 112 с целлюлозой до того, как первая стадия ферментативного гидролиза начала замедляться. На стадии  
45 120 реакционная смесь разделена на остаточную целлюлозу 122 и остающиеся 128 целлюлазы и глюкозу. Остаточную целлюлозу 122 подвергали декристаллизации 124, как показано на Фиг.2, с получением декристаллизованной остаточной целлюлозы 126, которую снова подвергают ферментативному гидролизу 130, используя оставшийся

раствор 128. Сахарные продукты затем ферментированы на стадии 114 для получения целлюлозного этанола 118.

Вариант осуществления второго многостадийного процесса показан на Фиг.6, и он основан на повторении процесса декристаллизации, как описано в настоящем описании, между гидролитическими стадиями. На стадии 132 декристаллизованная целлюлоза 108, как описано в настоящем описании, экспонировалась ферментам в течение периода времени, соответствующего ранней фазе быстрого гидролиза. Далее, на стадии 134, остаточная целлюлоза отделена от фермент-содержащей жидкой среды 142 путем фильтрации или центрифугирования. Остаточная целлюлоза 136 затем подвергнута второму циклу декристаллизации на стадии 138, как показано на Фиг.6, для получения декристаллизованной остаточной целлюлозы 140, которая, в свою очередь, опять экспонировалась в фермент-содержащем буферном водном растворе 142 для ферментативного гидролиза до глюкозы на стадии 144 перед ферментацией в целлюлозный этанол 118 на стадии 114. Предполагается, что гидролиз повторно проходит с более высокой скоростью, таким образом, что гидролиз целлюлозы может быть завершен за гораздо более короткое время, чем в случае одностадийного гидролиза. Так, один из главных факторов стоимости в процессах, основанных на этой модификации, который требует очень продолжительных периодов ожидания или времени пребывания в растворе ферментов, является преодоленным и значительно уменьшенным.

Вариант осуществления третьего многостадийного процесса показан на Фиг.7 и включает противоточное смешивание целлюлозы и раствора ферментов. На стадии 146 декристаллизованная, как описано в настоящем описании, целлюлоза 108 подвергают ферментам. На стадии 148 остаточная целлюлоза 150 отделяется от фермент-содержащей жидкой среды 149 путем фильтрации или центрифугирования. Остаточная целлюлоза 150 подвергается второму циклу декристаллизации на стадии 152 для получения декристаллизованной остаточной целлюлозы 154, которая, в свою очередь, экспонируется опять в фермент-содержащем буферном водном растворе на стадии 156. Как показано на Фиг.7, свежий фермент может быть использован на стадии 156 на второй стадии обработки, и после второй стадии обработки остаточная целлюлоза 160 отделяется на стадии 158 и затем вносится во второй цикл декристаллизации 152 для получения декристаллизованной остаточной целлюлозы 154 и затем снова вносится в ферментативный раствор 156. Более того, после фильтрации или полного растворения целлюлозы на стадии 158 ферментативный раствор 102 применяется снова к декристаллизованной целлюлозе на стадии 146. Сахарные продукты затем ферментируются со стадии 114 для получения целлюлозного этанола 118. Такой подход уменьшает количество фермента, необходимого для превращения целлюлозы в глюкозу. Стоимость ферментов является другим экономическим барьером для процессов, основанных на такой модификации.

Конкретный вариант осуществления третьего многостадийного процесса будет зависеть от природы целлюлозного сырья. Если целлюлоза была относительно чистой, ожидается, что превращение может быть завершено до того, как фермент-содержащий раствор добавлен к свежее-декристаллизованной целлюлозе. Однако, если сырье содержит другие компоненты лигноцеллюлозного вещества, то стадия фильтрации или центрифугирования может потребоваться перед применением раствора ферментов из второй стадии для обработки сырья в первой стадии.

Вариант осуществления изобретения также предполагается как набор, набор, содержащий щелочь в спирт/вода соразработителе, целлюлазные ферменты, один или более хлопьеобразующих агентов и инструкции для декристаллирования целлюлозы

для получения декристаллизованной целлюлозы и инструкции для гидролиза декристаллизованной целлюлозы для получения продукта гидролиза.

Также дополнительно представляется, что такая же обработка может сделать целлюлозу более доступной для растворов гомогенных катализаторов, которые могут  
5 быть использованы для трансформации целлюлозного сырья в другие формы. Например, декристаллизованная, как описано в настоящем описании, целлюлоза может быть более легко пропитываемой каталитическими системами для преобразования ее в углеводороды. Такие процессы могут сделать возможным применение огромных  
10 количеств целлюлозных ресурсов в качестве сырья для каталитического преобразования для производства биотоплива, такого как дизель, газовое горючее, такое как водород, и другие ценные химические соединения. Так, в некоторых вариантах осуществления предоставлен способ получения целлюлозного биотоплива. Способ включает обработку целлюлозного метриала щелочью в системе соразтворителей спирт/вода для получения  
15 декристаллизованной целлюлозы; отмывку декристаллизованной целлюлозы для удаления щелочи; гидролиз целлюлозы до глюкозы и целло-олигодекстринов и каталитическое преобразование глюкозы и целло-олигодекстринов в углеводороды.

Как отмечено выше, препятствием к более широкому применению целлюлозы в качестве сырья в производстве волокон или пленок является сложность в растворении целлюлозы в экологически приемлемой системе. Системы, наиболее часто используемые  
20 за территорией Соединенных Штатов, основаны на устаревшем на столетие целлюлоза-ксантогенатном процессе, который является вызывающим возражения с точки зрения экологии, поскольку регенерация целлюлозы из раствора приводит в образованию сероводорода и других токсичных побочных продуктов. Недавно разработанная метил-морфолин-N-оксид система основана на сложном и дорогостоящем растворителе,  
25 который подвержен взрывам, если условия контролируются недостаточно хорошо. С другой стороны, система соразтворителей, используемая в настоящем описании, является экологически безопасной. Предполагается, что система может кардинально изменить экономику изготовления искусственного шелка и целлофана, также как и биотоплива, как описано в настоящем описании.

Ниже следующие примеры, которые не должны быть истолкованы как  
30 ограничивающие объем изобретения, дополнительно объясняют варианты осуществления изобретения. Более того, все экспериментальные процессы могут быть дополнительно оптимизированы для эффективности, и процесс последовательного увеличения ожидается для достижения большего увеличения эффективности превращения  
35 целлюлозы в сахара.

#### ПРИМЕРЫ

Эксперименты для демонстрации снижения неподатливости целлюлозы проводились в две стадии. Первая включает процесс обработки нативной целлюлозы. Вторая  
40 определяет значение настоящей обработки путем экспонирования обработанных целлюлозных образцов гидролитическим ферментам и измерения их потери веса в сравнении с контролем, состоящим из необработанной нативной целлюлозы из того же самого источника.

Целлюлоза, выбранная в качестве субстрата для первого Примера, была из образца Avicel PH1, который использовался в качестве стандарта в лаборатории изобретателя  
45 с 1970-х и был поставлен American Viscose Company (Marcus Hook, PA). Это микрокристаллическая целлюлоза, обычно производимая кислотным гидролизом высокой чистоты, растворяющим качественную северную древесину хвойных пород, с последующим механическим разрушением древесных волокон и сушкой распылением



результатирующей дисперсии фрагментов волокон. Этот тип целлюлозы был выбран, потому что Avicel стал стандартным субстратом в исследованиях ферментативного гидролиза целлюлозы, и он является типичным представителем наиболее неподдающихся воздействию целлюлоз, полученных из древесины. Во втором наборе Примеров была использована крафт-целлюлоза, полученная из туалетной бумаги. В еще одном Примере была использована органически-растворимая древесина (organosolv pulp).

Ферменты, использованные в оценке, были целлюлаза из грибов *Trichoderma reesi*, закупленная у Worthington, и глюкозидаза, произведенная из миндаля, имеющегося в наличии у Sigma Aldrich.

#### Пример 1

##### Декристаллизация

Раствор, приготовленный для обработки Avicel, был 1,5 н. раствором гидроксида натрия (NaOH) в смеси с этанолом (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) и водой, такой, что этанол составлял 75% по объему. Для приготовления раствора для обработки этанол и вода были смешаны, и затем 6 г NaOH растворено на каждые 100 мл смеси растворителей.

Процедура обработки была следующей: 1 г Avicel был помещен в 300-мл мерный стакан. К этому было добавлено 50 мл раствора для обработки. Avicel находился в растворе для обработки 15 минут. После этого раствор был слит и заменен 100 мл смесью растворителей (75% этанол, 25% вода). Этот раствор постоял несколько минут для диффузии NaOH из целлюлозы в раствор.

Растворитель затем был слит и процесс повторен два раза, после чего был достигнут рН приблизительно 8. После слива растворителя последний раз был добавлен раствор 0,05 М аммоний-ацетатного буфера при рН 5; рН составил 5,4 после промывки в буфере. Буферный раствор был слит и добавлено снова 30 мл буфера; после этого рН составил 5,0.

Дисперсия целлюлозы в 30 мл буфера была перемещена в 50 мл полипропиленовую центрифужную пробирку, и добавлен буфер до уровня 40 мл. Гидролитические ферменты были добавлены в пробирку. Этими ферментами были 0,2 г целлюлазы (108 мкМ/мг) и 0,1 г β-глюкозидазы (6 мкМ/мг).

Контрольный образец необработанной Avicel был также помещен в 50 мл полипропиленовую центрифужную пробирку и к нему добавлено 40 мл буфера с последующим добавлением ферментов в том же количестве, что и в тестовом образце.

Две центрифужные пробирки были затем плотно закрыты крышками и вставлены в Vortemp 1550 инкубатор со встряхиванием. Содержимое пробирок инкубировалось при 45°C и встряхивалось при скорости 900 об/мин. Было найдено, что необходимо встряхивание при 900 об/мин для поддержания адекватной дисперсии частиц микрокристаллической целлюлозы.

Для первого эксперимента инкубацию проводили в течение 41 часа и для второй инкубации проводили в течение 13 часов.

После инкубации две дисперсии были каждая разделены на 8 порций в 15-мл центрифужных пробирках. Пробирки были вставлены в центрифугу и откручены при 3800 об/мин в течение 2 минут. Жидкость буфер-фермент была отобрана из каждой пробирки и замещена 95% этанолом, повторно диспергирована и снова проведено центрифугирование; это было выполнено дважды для каждого из образцов. Последний отобранный этанол был замещен ацетоном с последующей дисперсией в ацетоне.

Дисперсия в ацетоне была затем, в свою очередь, перелита в контейнер с фильтром из спеченного стекла на дне; контейнеры с фильтрами были закреплены на вакуумном флаконе с применением полного вакуума в процессе фильтрации. Контейнеры были

далее перенесены в вакуумную печь с применением полного вакуума, нагреты до 105°C и выдерживались при этой температуре под вакуумом в течение ночи.

Затем образцы были взвешены на аналитических весах, и измеренная потеря веса взята как мера превращения целлюлозы в глюкозу и растворимые олигомеры.

5 Должно быть отмечено, что 1,5 М (или 1,5 н.) раствор NaOH в смеси растворителей был выбран, потому что микрокристаллическая целлюлоза Avicel была получена из растворимой целлюлозы. Если бы микрокристаллическая целлюлоза была получена из хлопка, то было бы необходимо использовать 2 М (или 2 н.) раствор NaOH в растворителе. Противоположно, если бы целлюлоза была выделена из травянистого  
10 растения при температуре, более близкой к температуре окружающей среды, то 1 М (или 1 н.) раствор мог бы быть более адекватным. Эта вариабельность в нормальности, неоходимой для предварительной обработки целлюлозы, отражает значительную разнородность в уровне агрегации целлюлоз из различных источников и с различной динамикой в семикристаллических доменах.

15 **Результаты:**

Как указано выше, первоначальный вес тестовых и контрольных образцов составлял 1 г каждый. Вес после инкубирования со смесью ферментов при 45°C дан ниже в Таблице 1.

20

Время инкубации	Контроль	С предварительной обработкой	Δ
13 часов	0,535 г	0,408 г	0,127 г
41 часов	0,251 г	0,189 г	0,062 г

25

Где Δ обозначает разницу в потере веса между контрольным и образцом с предварительной обработкой. Так, в обоих примерах потеря веса образца, обработанного, как описано в настоящем описании, была значительно выше, чем у контрольного образца.

30

Результаты показывают, что потеря веса для обоих образцов в течение первых 13 часов экспозиции была значительно выше, чем потеря веса в течение следующей экспозиции в течение дополнительных 28 часов. Это типично для двухфазной природы действия фермента на целлюлозы, где соотношение превращения в глюкозу или растворимые олигомеры осуществляется быстро сначала, но затем уровни снижаются до гораздо более низких показателей. Результаты этих экспериментов показывают, что декристаллизующая обработка, описанная в настоящем описании, увеличивает  
35 неупорядоченность в целлюлозном субстрате и делает его более подверженным ферментативному гидролизу целлюлазами.

### Пример 2

#### Двухстадийный процесс

40

Раствор, приготовленный для обработки Avicel, представлял собой 1,5 н. раствор гидроксида натрия (NaOH) в смеси этанола (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) и воды, такой, что этанол составлял 75% по объему. Для приготовления раствора для обработки необходимо смешать этанол и воду и затем растворить 6 г NaOH на 100 мл смеси растворителей.

45

Процедура обработки была следующей: 2 образца Avicel, весом 1 г каждый, были помещены в 50 мл центрифужные пробирки, одна - с экспериментальным образцом и одна - с контрольным. В каждую пробирку было добавлено 45 мл 0,05 н аммоний-ацетатного буфера с рН 5,01. В обе пробирки добавили 0,15 г целлюлазы, с 136 мкм/мг DW, без дополнительной β-глюкозидазы.

Оба образца были помещены в Vortemp 1550 инкубатор со встряхиванием. Они были

инкубированы при 50°C и скорости встряхивания 900 об/мин. Первоначальную инкубацию проводили в течение 5,5 часов.

После первоначального инкубационного периода экспериментальный образец был убран из инкубатора и охлажден на ледяной бане для остановки ферментативной реакции. Экспериментальный образец затем был помещен в центрифугу и отцентрифугирован при 4500 об/мин для отделения супернатанта. Супернатант был отобран и сохранен для последующего возвращения в пробирку с образцом.

Затем в пробирку с образцом добавили 50 мл NaOH раствора для обработки, встряхивали в течение 5 минут, после чего пробирку повторно подвергли центрифугированию для отделения раствора для обработки.

После этого раствор был отобран и заменен 50 мл смесью растворителей (75% этанол, 25% вода). Его встряхивали в течение 5 минут для обеспечения диффузии NaOH из целлюлозы. Затем он был повторно подвержен центрифугированию при 4500 об/мин.

Затем раствор был отобран, и процесс повторен два раза. После последнего отбора растворителя был добавлен раствор 0,05 М аммоний-ацетатного буфера при pH 5,01; pH составил 8,4 после диспергирования образца в буфере. Буферный раствор был повторно подвержен центрифугированию и отобран, и 40 мл буфера добавлено снова; затем pH был определен как 5,15. Этот цикл был повторен еще один раз, после чего pH образца в буфере составил 5,04. Затем буфер удаляли.

Супернатант раствора ферментов, отобранный ранее, был возвращен в пробирку с образцом, и инкубация была возобновлена при 50°C и 900 об/мин. Вторая стадия инкубации продолжалась 2,5 часа.

После инкубации обе - экспериментальная и контрольная пробирки были помещены в центрифугу и повторно подвержены центрифугированию в течение 2 минут при 4500 об/мин. Жидкость буфер-фермент была отобрана из каждой пробирки, и остающееся твердое вещество перемещено на протарированную стекловолоконную бумагу для высушивания в микроволновой печи со встроенными аналитическими весами, и измеренная потеря веса взята как мера превращения целлюлозы в глюкозу и растворимые олигомеры.

Результаты:

Как указано выше, первоначальный вес тестовых и контрольных образцов составлял 1 г каждый. Вес после инкубирования со смесью ферментов при 50°C представлен ниже в Таблице 2.

Время инкубации	Контроль	С предварительной обработкой	Δ
8 часов	0,529 г	0,269 г	0,26 г

Где Δ обозначает разницу в потере веса между контрольным образцом и образцом с предварительной обработкой. Так, потеря веса образца, обработанного, как описано в настоящем описании, была значительно выше, чем у контрольного образца.

### Пример 3

Двухстадийный процесс обработки с использованием бумаги из крафт-целлюлозы Раствор, приготовленный для обработки туалетной бумаги (марка Cottonelle™) представлял собой 1,5 н. раствор гидроксида натрия (NaOH) в смеси этанола (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) и воды, такой, что этанол составлял 75% по объему. Приготовление раствора для обработки было таким же, как описано в предыдущих примерах.

Процедура обработки была следующей: 2 образца (один контрольный и один экспериментальный образцы) туалетной бумаги были взвешены и затем порезаны на

мелкие кусочки и были помещены в 50 мл центрифужные пробирки. Пробирки были наполнены водой и помещены в Vortemp 1550 инкубатор со встряхиванием при комнатной температуре и 900 об/мин и оставлены для диспергирования в течение ночи.

Каждая пробирка была наполнена до отметки 50 мл 0,05 н аммоний-ацетатным буфером, имеющим рН 5,01. В обе пробирки добавили 0,125 г целлюлазы, с 136 мкм/мг DW, без дополнительной  $\beta$ -глюкозидазы. Оба образца были помещены в Vortemp инкубатор. Они были инкубированы при 50°C и 900 об/мин. Первоначальную инкубацию проводили в течение 4,25 часов.

После первоначального инкубационного периода оба образца были удалены из инкубатора и охлаждены на ледяной бане для остановки ферментативной реакции. Экспериментальный образец затем был помещен в центрифугу и повторно подвержен центрифугированию при 4500 об/мин для отделения супернатанта. Супернатант был отобран и сохранен для последующего возвращения в пробирку с образцом.

Затем в пробирку с образцом добавили 50 мл NaOH раствора для обработки, встряхивали в течение 2 минут, после чего пробирка была снова помещена в центрифугу и повторно подвержена центрифугированию для отделения раствора для обработки.

После этого раствор был отобран и заменен 50 мл смесью растворителей (75% этанол, 25% вода). Его встряхивали в течение 2 минут для обеспечения диффузии NaOH из целлюлозы.

Затем раствор был отобран, и процесс повторен два раза. После последнего отбора растворителя был добавлен раствор 0,05 М аммоний-ацетатного буфера при рН 5,01; рН составил 6,4 после диспергирования образца в буфере. Буферный раствор был повторно подвержен центрифугированию и отобран и 40 мл буфера добавлено снова; затем рН был определен как 5,23. Супернатант раствора ферментов, отобранный ранее, был возвращен в пробирку с образцом, и инкубация была возобновлена при 50°C и 900 об/мин. Вторая стадия инкубации продолжалась приблизительно 9,5 часов.

После инкубации обе - экспериментальная и контрольная пробирки были помещены в центрифугу и повторно подвержены центрифугированию в течение 2 минут при 4500 об/мин. Жидкость буфер-фермент была отобрана из каждой пробирки, и остающееся твердое вещество перемещено на протарированную стекловолоконную бумагу для высушивания в микроволновой печи со встроенными аналитическими весами, измеренная потеря веса была взята как мера превращения целлюлозы в глюкозу и растворимые олигомеры.

#### Результаты:

Первоначальный вес тестовых и контрольных образцов, наряду с весом после инкубации с ферментативной смесью при 50°C, представлен ниже в Таблице 3

Таблица 3			
	Первоначальный вес	Конечный вес	% превращения
Контроль	1,021 г	0,314 г	69,25%
С предварительной обработкой	1,026 г	0,226 г	77,97%

Различие в процентном содержании остающегося веса образца показывает, что превращение образца, обработанного, как описано в настоящем описании, было выше, чем у контрольного образца.

#### Пример 4

##### Одностадийная обработка с использованием бумаги из крафт-целлюлозы

Раствор, приготовленный для обработки туалетной бумаги (марка Cottonelle™), представлял собой 1,5 н. раствор гидроксида натрия (NaOH) в смеси этанола (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)

и воды, такой, что этанол составлял 75% по объему. Приготовление раствора для обработки было таким же, как описано в предыдущих примерах.

Процедура обработки была следующей: 2 образца (один контрольный и один экспериментальный образцы) туалетной бумаги были взвешены и затем порезаны на  
5 мелкие кусочки и были помещены в 50 мл центрифужные пробирки. Пробирки были наполнены водой и помещены в Vortemp 1550 инкубатор со встряхиванием при комнатной температуре и 900 об/мин и оставлены для диспергирования в течение ночи.

Экспериментальный образец был помещен в центрифугу и повторно подвержен центрифугированию в течение 2 минут при 4500 об/мин, и вода, подверженная  
10 центрифугированию, была отобрана. Пробирка была заново наполнена этанолом (200 ргf. этанола) и ее встряхивали в течение 5 минут при 900 об/мин, после чего пробирка была снова подвержена центрифугированию, этанол отобран, и пробирка затем была наполнена смесью 75% этанола и 25% воды, ее встряхивали в течение 5 минут, повторно подвергли центрифугированию, и раствор отобран.

15 Затем в пробирку с образцом добавили 50 мл NaOH раствора для обработки, встряхивали в течение 5 минут, после чего снова поместили в центрифугу для отделения раствора для обработки.

После этого раствор был отобран и заменен 50 мл смесью растворителей (75% этанол, 25% вода). Его встряхивали в течение 5 минут для обеспечения диффузии NaOH из  
20 целлюлозы.

Затем раствор был отобран, и процесс повторен два раза. После последнего отбора растворителя был добавлен раствор 0,05 М аммоний-ацетатного буфера при рН 5,01; рН составил 12,63 после диспергирования образца в буфере. Буферный раствор был повторно подвержен центрифугированию и удален, и 40 мл буфера добавлено снова;  
25 затем рН был определен как 9,37. Этот цикл был повторен еще 4 раза с определением рН на уровне 6,02, 5,29, 5,24, и затем 5,05 в последнем цикле.

Контрольная пробирка была наполнена до 50 мл отметки тем же раствором 0,05 н аммоний-ацетатного буфера. В обе пробирки добавили 0,125 г целлюлазы с 136 мкм/мг DW, без дополнительной β-глюкозидазы. Оба образца были помещены в Vortemp  
30 1550 инкубатор со встряхиванием. Они были инкубированы при 50°C и 900 об/мин в течение общего времени инкубации 16 часов и 25 минут.

После инкубации обе - экспериментальная и контрольная пробирки были помещены в центрифугу и повторно подвержены центрифугированию в течение 2 минут при 4500 об/мин. Жидкость буфер-фермент была отобрана из каждой пробирки, и остающееся  
35 твердое вещество перемещено на протарированную стекловолоконную бумагу для высушивания в микроволновой печи со встроенными аналитическими весами, измеренная потеря веса была взята как мера превращения целлюлозы в глюкозу и растворимые олигомеры.

#### Результаты:

40 Первоначальный вес тестовых и контрольных образцов, наряду с весом после инкубации с ферментативной смесью в течение 16 часов и 25 минут при 50°C, представлен ниже в Таблице 4.

Таблица 4			
	Первоначальный вес	Конечный вес	% превращения
Контроль	1,020 г	0,367	64,02%
С предварительной обработкой	1,017 г	0,225 г	77,88%

Различие в процентном содержании остающегося веса образца показывает, что превращение образца, обработанного, как описано в настоящем описании, было выше,

чем у контрольного образца.

#### Пример 5

##### Двухстадийная обработка с использованием древесной массы

5 Древесная масса (organosolv pulp) (например, патент США № 4100016) была первоначально обработана хлоритом натрия для делигнификации, после чего была высушена на воздухе. Обработка хлоритом натрия является общепринятой мягко отбеливающей техникой. Два образца (один контрольный и один экспериментальный образец) были взвешены из получившейся делигнифицированной высушенной массы.

10 Раствор, приготовленный для обработки делигнифицированной древесной массы (organosolv pulp), представлял собой 1,5 н. раствор гидроксида натрия (NaOH) в смеси этанола (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) и воды, такой, что этанол составлял 75% по объему. Приготовление раствора для обработки было таким же, как описано в предыдущих примерах.

15 Процедура обработки была следующей: 2 образца (один контрольный и один экспериментальный образцы) массы были взвешены и затем помещены в 50 мл центрифужные пробирки. Пробирки были наполнены водой и помещены в Vortemp 1550 инкубатор со встряхиванием при комнатной температуре и 900 об/мин и оставлены для диспергирования на два дня. После дисперсии обе пробирки были помещены в центрифугу и повторно подвержены центрифугированию при 4500 об/мин в течение приблизительно 3 минут, после чего вода была отобрана.

20 Каждая пробирка затем была наполнена до отметки 50 мл 0,05 н аммоний-ацетатным буфером при pH 5,01. В обе пробирки добавили 0,2 г целлюлазы, с 136 мкм/мг DW, без дополнительной β-глюкозидазы. Оба образца были помещены в Vortemp инкубатор. Они были инкубированы при 50°C и 900 об/мин. Первоначальную инкубацию проводили в течение 5,5 часов.

25 После первоначального инкубационного периода оба образца были удалены из инкубатора. Экспериментальный образец затем был помещен в центрифугу, и снова проведено центрифугирование в течение 7 минут при 4500 об/мин для отделения супернатанта. Супернатант был отобран и сохранен для последующего возвращения в пробирку с образцом.

30 Затем в пробирку с образцом добавили 50 мл NaOH раствора для обработки, встряхивали в течение 2 минут, после чего пробирка была снова помещена в центрифугу и повторно подвержена центрифугированию для отделения раствора для обработки.

35 После этого раствор был отобран и заменен 50 мл смесью растворителей (75% этанол, 25% вода). Его встряхивали в течение 2 минут для обеспечения диффузии NaOH из целлюлозы.

40 Затем раствор был отобран, и процесс повторен два раза. После последнего отбора растворителя был добавлен раствор 0,05 М аммоний-ацетатного буфера при pH 5,01; pH составил 7,32 после диспергирования образца в буфере. Буферный раствор был повторно подвержен центрифугированию и отобран, и 40 мл буфера добавлено снова; затем pH был определен как 5,18. Супернатант раствора ферментов, отобранный ранее, был возвращен в пробирку с образцом, и инкубация была возобновлена при 50°C и 900 об/мин. Вторая стадия инкубации продолжалась примерно 3,5 часа.

45 После инкубации обе - экспериментальная и контрольная пробирки были помещены в центрифугу и повторно подвержены центрифугированию в течение 2 минут при 4500 об/мин. Жидкость буфер-фермент была отобрана из каждой пробирки, и остающееся твердое вещество перемещено на протарированную стекловолоконную бумагу для высушивания в микроволновой печи со встроенными аналитическими весами, измеренная потеря веса была взята как мера превращения целлюлозы в глюкозу и

растворимые олигомеры.

Результаты:

Первоначальный вес тестовых и контрольных образцов, наряду с весом после инкубации с ферментативной смесью при 50°C, представлен ниже в Таблице 5.

5

Таблица 5			
	Первоначальный вес	Конечный вес	% превращения
Контроль	1,003 г	0,539 г	46,26%
С предварительной обработкой	1,005 г	0,409 г	59,3%

10

Различие в процентном содержании остающегося веса образца показывает, что превращение образца, обработанного, как описано в настоящем описании, было выше, чем у контрольного образца.

15

Вышеприведенное описание представлено с целью иллюстрации принципов изобретения. Более того, поскольку множественные модификации и изменения могут быть легко представлены специалистом в области техники, не является желательным ограничивать изобретение точными конструкциями и операциями, показанными и описанными, и соответственно, все подходящие модификации и эквиваленты рассматриваются как попадающие в объем изобретения. Различные характерные особенности и преимущества изобретения представлены в нижеследующей формуле изобретения.

20

25

Все публикации, патенты и патентные заявки, на которые есть ссылки в настоящей спецификации, указывают на уровень среднего специалиста в области техники, к которой относится данное изобретение. Все публикации, патенты и патентные заявки в настоящем описании являются безоговорочно включенными посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация или патентная заявка были особым образом и индивидуально отмечены ссылкой. В случае конфликта между настоящим изобретением и включенными патентами, публикациями и ссылками настоящее изобретение должно преобладать.

#### Формула изобретения

30

1. Способ дезагрегирования или декристаллизации целлюлозы, включающий: обработку целлюлозного материала щелочью, которая имеет концентрацию более чем 1М, в системе соразтворителей для получения дезагрегированной или декристаллизованной целлюлозы, причем система соразтворителей включает воду и второй водорастворимый растворитель в соотношении 25:75, где водорастворимый растворитель является органическим полярным растворителем, который представляет собой первичный, вторичный или третичный спирт или полиол, и отмывку дезагрегированной или декристаллизованной целлюлозы соразтворителем для удаления щелочи и стабилизации дезагрегированной или декристаллизованной целлюлозы в водной среде.

35

40

2. Способ по п.1, дополнительно включающий ферментативный гидролиз дезагрегированной или декристаллизованной целлюлозы, стабилизированной в водной среде, с получением одного или более сахаров.

3. Способ по п.2, где сахар является глюкозой для использования в качестве сырья для получения биотоплива.

45

4. Способ по п.2, дополнительно включающий ферментирование сахаров с получением этанола в ферментационной смеси и выделение этанола из ферментационной смеси.

5. Способ по п.4, дополнительно включающий повторное использование части

продуцированного этанола на стадии обработки и/или для получения системы соразтворителей спирт/вода.

6. Деагрегированная или декристаллизованная целлюлоза, полученная способом по п.1 или 2.

5 7. Набор для осуществления способа по любому из пп.1-5, где набор включает щелочь в системе соразтворителей спирт/вода и инструкции для деагрегирования или декристаллизации целлюлозы для получения деагрегированной или декристаллизованной целлюлозы.

8. Способ получения биотоплива, включающий:

10 а) ферментативный гидролиз целлюлозного материала целлюлазами в течение времени, соответствующего первой фазе двухфазного ферментативного гидролиза, для получения глюкозы и остаточной целлюлозы;

б) обработку остаточной целлюлозы способом по п.1 для получения деагрегированной или декристаллизованной целлюлозы;

15 в) отмывку деагрегированной или декристаллизованной целлюлозы соразтворителем для удаления щелочи и

д) гидролиз деагрегированной и декристаллизованной целлюлозы до глюкозы и целло-олигодекстринов.

9. Способ по п.8, где гидролиз стадии (d) осуществляют ферментами со стадии (a).

20 10. Способ по п.8 или 9, дополнительно включающий ферментирование глюкозы и целло-олигодекстринов в спирты.

25

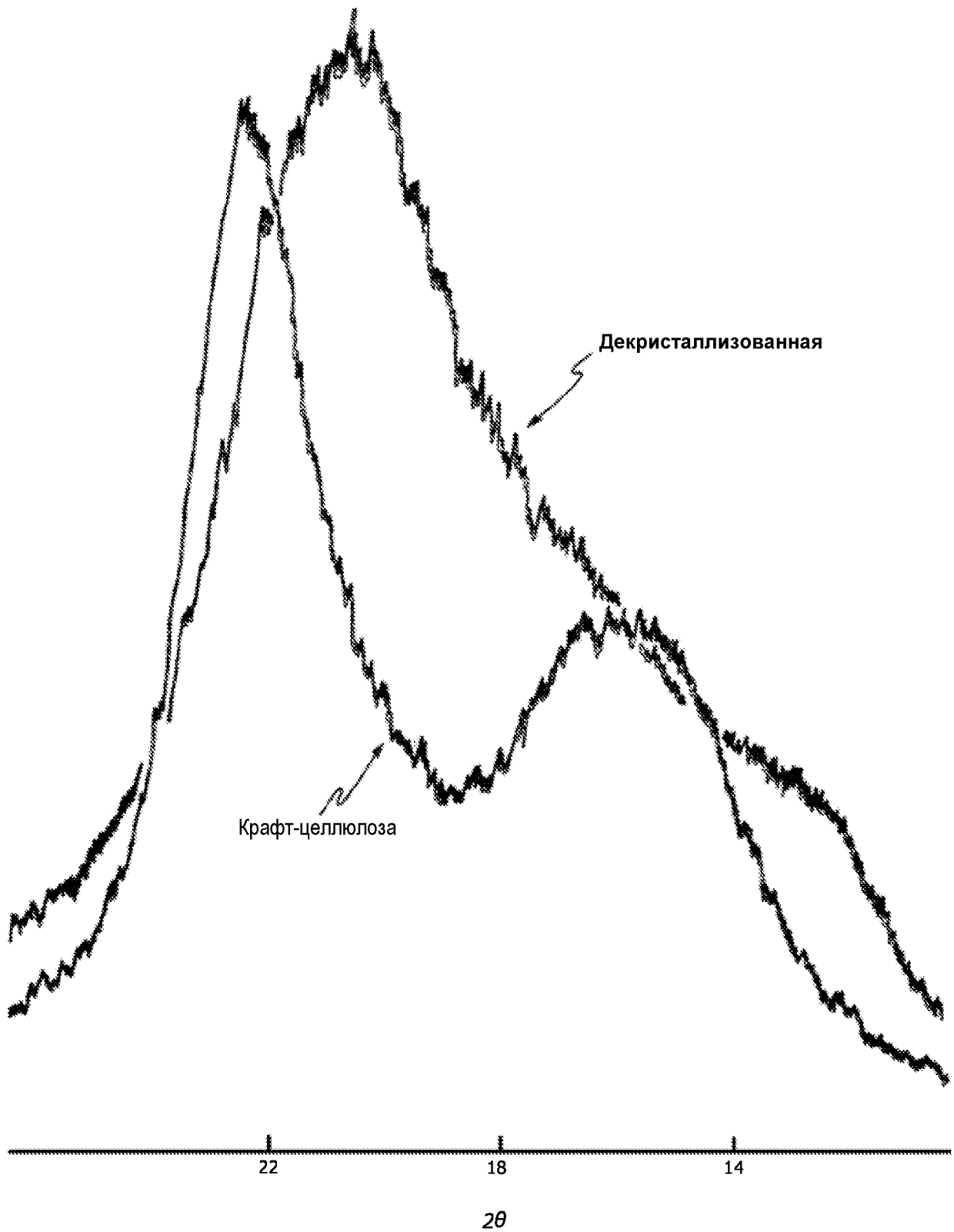
30

35

40

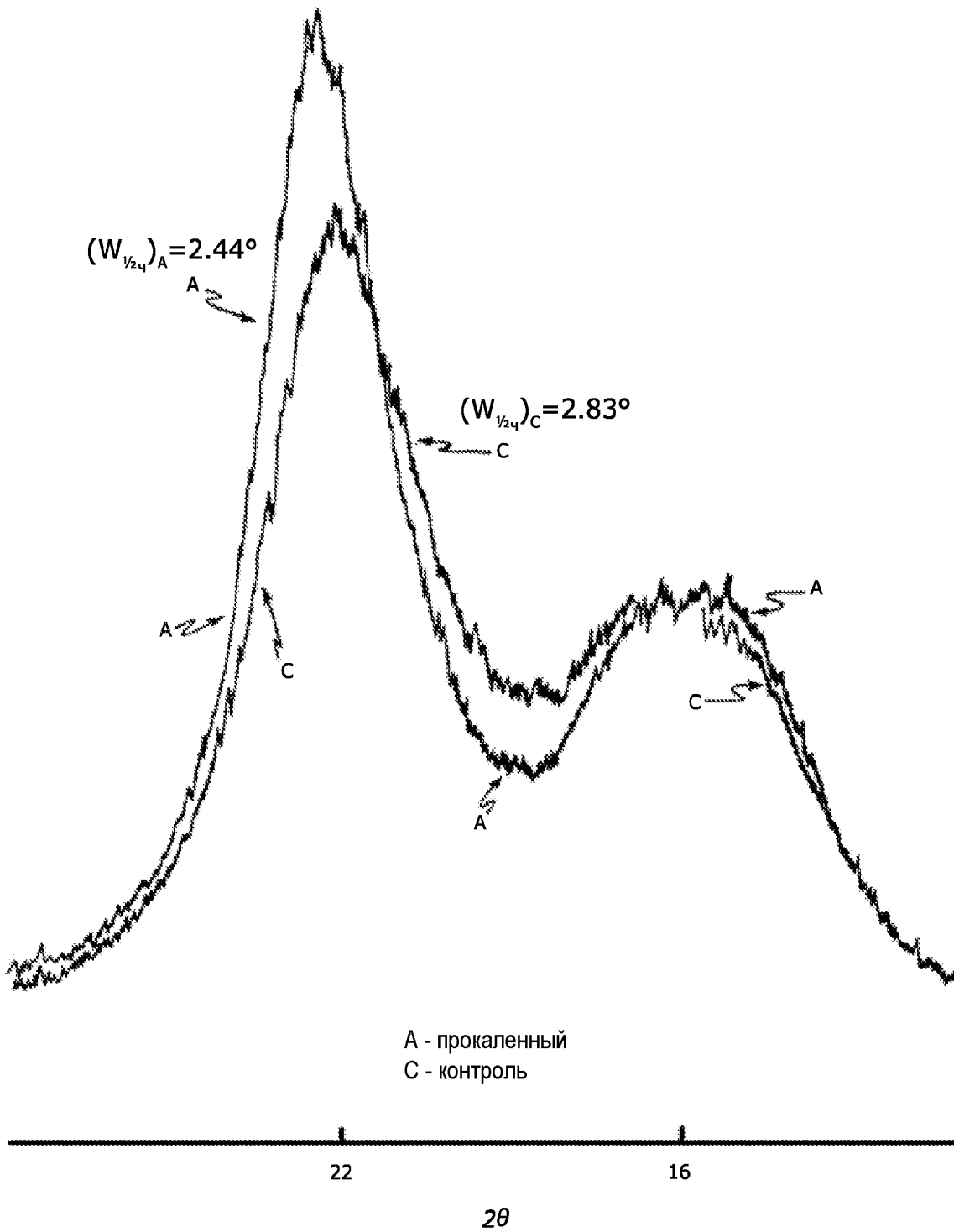
45





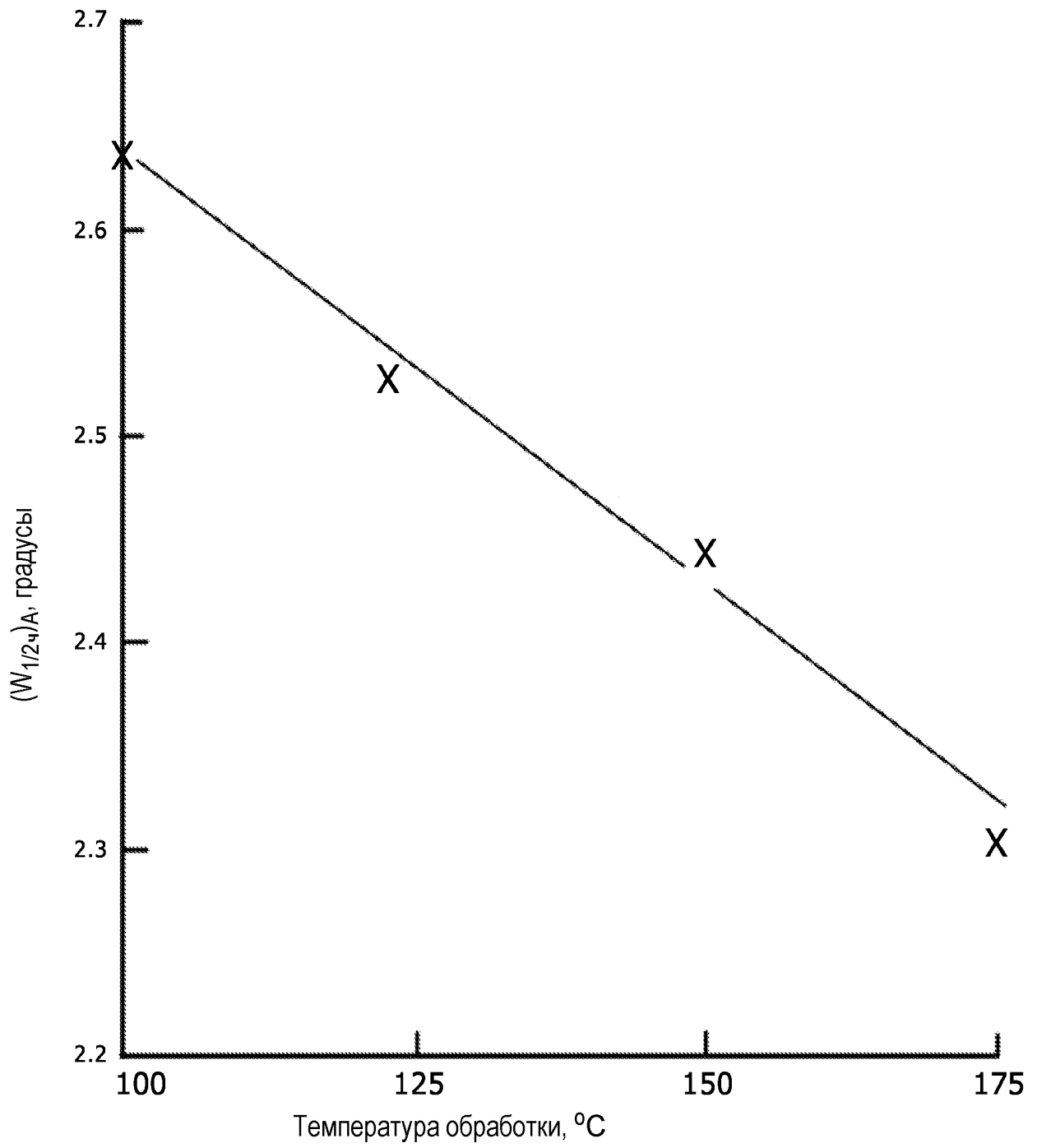
Рентгеновские дифрактограммы беленой kraft-целлюлозы перед и после декристаллизующей обработки

Фиг. 1



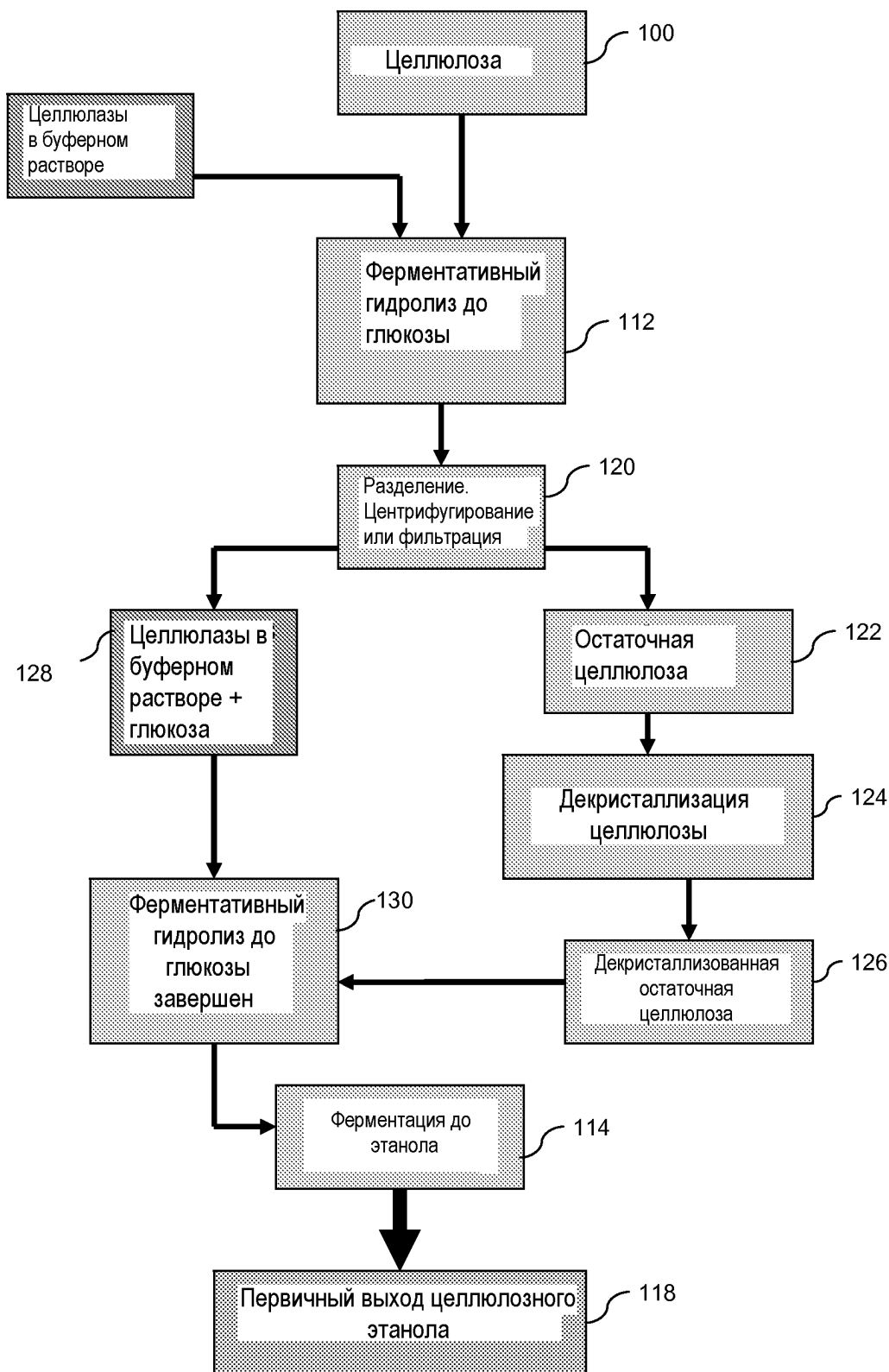
Рентгеновские дифрактограммы целлюлозы, изолированной из ложной сосны. (с) контроль, превращенный в пульпу при 60°C, (А) прокаленный, нагретый до 150°C в воде.

Фиг. 3

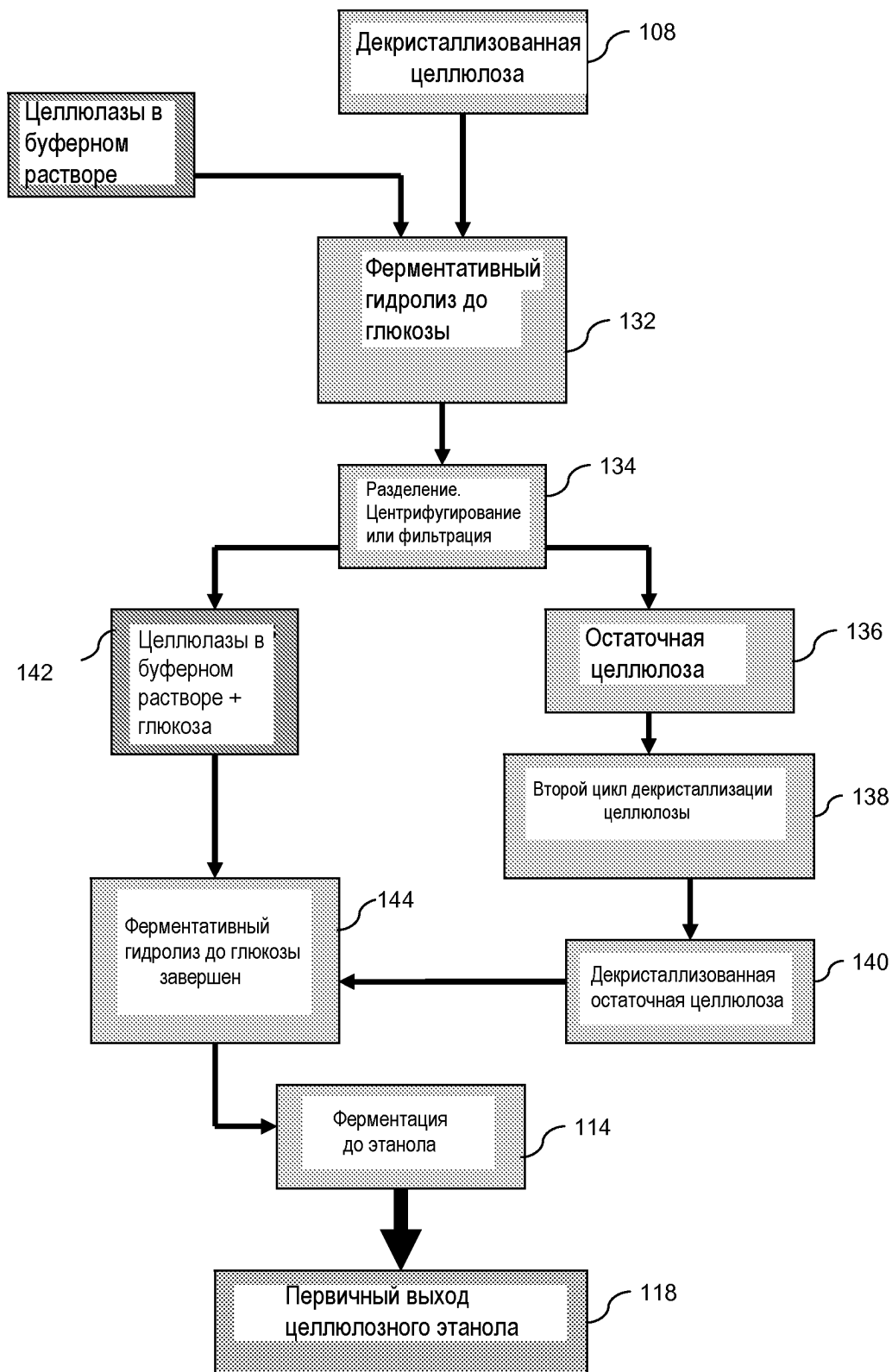


Ширина на полувьоте образцов, прокаленных при различных температурах

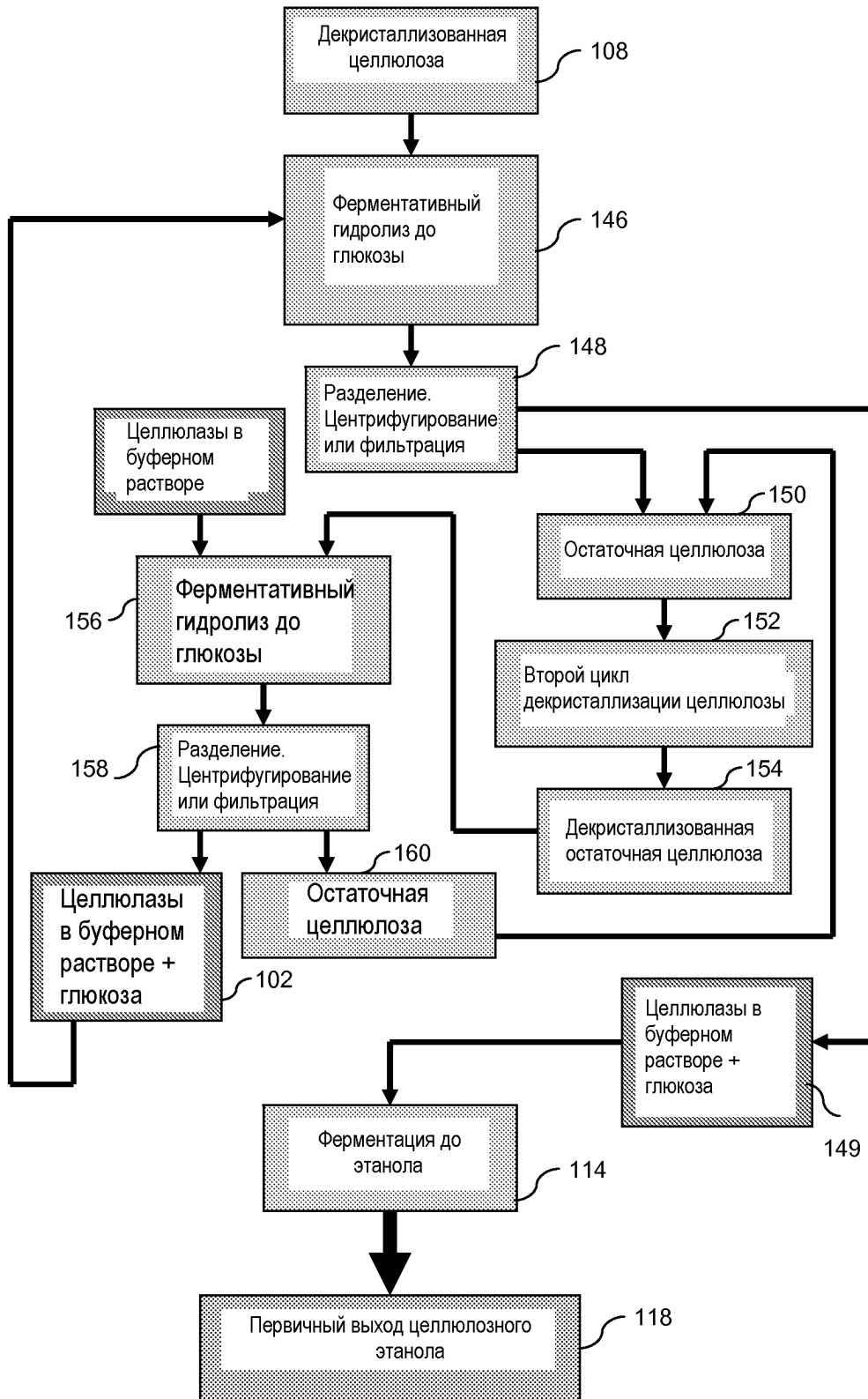
ФИГ. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7