

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102257150 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 23

(21) 申请号 200980150825. 9

C13K 1/02 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 12. 16

D21C 3/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

D21C 3/20 (2006. 01)

61/139147 2008. 12. 19 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 06. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/068224 2009. 12. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02010/080434 EN 2010. 07. 15

(71) 申请人 纳慕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 B·A·迪纳 J·范

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 孟慧岚 李炳爱

(51) Int. Cl.

C12P 7/10 (2006. 01)

C12P 19/04 (2006. 01)

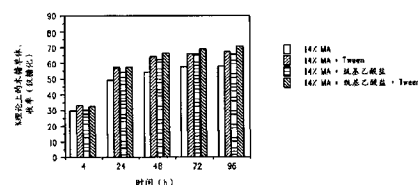
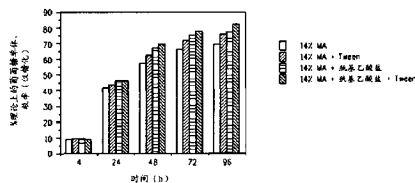
权利要求书 2 页 说明书 31 页 附图 6 页

(54) 发明名称

有机溶剂预处理生物质以增强酶解糖化

(57) 摘要

在一种或多种烷基胺和任选地一种或多种附加的亲核物质的存在下,在碱性条件下用有机溶剂溶液预处理生物质以破碎和萃取木质素。经过预处理的生物质被糖化酶聚生体进一步水解。通过糖化释放的可发酵的糖可被用于通过发酵生产目标化学制品。



1. 用于生产富集碳水化合物的生物质的方法,所述方法包括:
 - (a) 提供包含木质素的木质纤维质生物质;
 - (b) 在碱性条件下将 (a) 的生物质悬浮于包含水和一种或多种烷基胺的有机溶剂溶液中,从而形成生物质-溶剂悬浮液;
 - (c) 将所述生物质-溶剂悬浮液加热至约 100°C 至约 220°C 的温度 5 分钟至约 5 小时,从而木质素被破碎并溶解于所述悬浮液中;以及
 - (d) 过滤自由液体,从而溶解的木质素被除去,并且从而生产了富集碳水化合物的生物质。
2. 权利要求 1 的方法,所述方法还包括:
 - (e) 用溶剂溶液洗涤步骤 (d) 中生产的生物质。
3. 权利要求 2 的方法,所述方法还包括:
 - (f) 用水洗涤步骤 (e) 中生产的生物质以生产易于糖化的富集碳水化合物的生物质。
4. 权利要求 2 的方法,所述方法还包括干燥步骤 (e) 中生产的生物质以生产易于糖化的富集碳水化合物的生物质。
5. 权利要求 2 或 3 的方法,所述方法还包括重复步骤 (e) 和 (f) 一次或多次。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述加热步骤 (c) 在密封的压力容器中进行。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述过滤步骤 (d) 在压力下进行。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述一种或多种烷基胺选自:R-NH₂, R₂-NH, R₃N, (H₂N-R-NH₂), (H₂N-R(NH₂)₂), (HO-R-NH₂), ((HO)₂-R-NH₂), (HO-R-(NH₂)₂), (HS-R-NH₂), ((HS)₂-R-NH₂), (HS-R-(NH₂)₂) 和 (H₂N-R(OH)(SH)) 以及它们的组合,其中 R 独立地为一价、二价或三价的 1-6 个碳的直链的、环状的或支链的烷烃、烯烃或炔烃。
9. 权利要求 8 的方法,其中 R 独立地为甲基、乙基、丙基或丁基。
10. 权利要求 8 的方法,其中所述烷基胺为甲胺。
11. 权利要求 8 的方法,其中所述烷基胺的浓度按干燥生物质的重量计约至多 20%。
12. 权利要求 1 的方法,其中在步骤 (b) 中所述有机溶剂溶液对生物质具有约 10 比 1 至 0.5 比 1 的重量比。
13. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (c) 的加热的悬浮液在步骤 (d) 中的过滤之前被冷却至室温。
14. 权利要求 2 的方法,所述方法还包括在步骤 (e) 之后移除经过过滤和洗涤的生物质的溶剂,以生产易于糖化的富集碳水化合物的生物质。
15. 权利要求 3、4 或 14 的方法,所述方法还包括用酶聚生体使所述易于糖化的富集碳水化合物的生物质糖化,从而生产可发酵的糖。
16. 权利要求 3 的方法,所述方法包括在步骤 (f) 中用水洗涤之后使所述生物质与酶聚生体接触。
17. 权利要求 15 的方法,所述方法包括使所述糖发酵以生产目标产物。
18. 权利要求 17 的方法,其中所述目标产物选自醇、有机酸、氨基酸和气体。
19. 权利要求 1 的方法,其中所述生物质选自:柳枝稷、废纸、来自造纸业的淤渣、玉米纤维、玉米芯、玉米壳、玉米秸秆、草、小麦、小麦秸秆、干草、大麦、大麦秸秆、稻秆、蔗渣、甘蔗秸秆、黄杨、高粱、大豆、得自谷物加工过程的组分、树、树枝、根、叶、木屑、锯末、灌木和灌

丛、蔬菜、水果、花、动物粪肥、以及它们的组合。

20. 同时破碎和从木质纤维质生物质中选择性地萃取木质素以生产基本上不含木质素的生物质的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供:

- 1) 一定量的木质纤维质生物质;
- 2) 多组分溶剂溶液,所述溶液在水中包含约 40%至约 70%的乙醇;和
- 3) 碱性条件下的一种或多种烷基胺;

(b) 使所述生物质与 (a) 的多组分溶剂溶液接触以形成溶剂-生物质混合物;

(c) 将所述溶剂-生物质混合物置于密封的压力容器中,由此将 (b) 的混合物在约 100°C至约 220°C的温度加热约 5 分钟至约 5 小时,从而木质素被破碎并溶解于所述溶剂中;

(d) 通过过滤除去 (c) 的溶解的木质素;和

(e) 用有机溶剂洗涤残余的生物质,从而生产了基本上不含木质素的生物质。

21. 权利要求 20 的方法,其中步骤 (e) 的溶剂可包含水。

22. 权利要求 20 的方法,其中步骤 (c) 的温度为约 165°C至约 195°C。

23. 权利要求 20 的方法,其中步骤 (c) 进行 60 分钟至约 140 分钟。

24. 权利要求 20 的方法,其中所述基本上不含木质素的生物质为所述生物质初始重量的约 60%至约 100%。

25. 权利要求 1 或 20 的方法,其中所述有机溶剂溶液还包含一种或附加组分,其选自碱金属或碱土金属的氢氧化物或碳酸盐、氨、硫醇、多硫化物或硫化物或它们的组合。

26. 权利要求 1 或 20 的方法,其中所述溶剂溶液和任何未反应的烷基胺或其他未反应的组分是可循环利用的。

27. 权利要求 1 或 20 的方法,其中所述有机溶剂溶液包含选自醇、二醇、和非质子溶剂的溶剂。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述有机溶剂溶液包含选自甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、戊醇和己醇、它们的异构体、以及它们的二醇的溶剂。

29. 权利要求 1 或 20 的方法,其中步骤 (a) 的木质纤维质生物质从步骤 (a) 至 (d) 具有高度保留的碳水化合物含量。

有机溶剂预处理生物质以增强酶解糖化

[0001] 本专利申请要求 2008 年 12 月 19 日提交的美国临时申请 61/139147 的权益,其公开内容全文并入本文。

发明领域

[0002] 提供了用于生产易于糖化的富集碳水化合物的木质纤维质生物质的方法。具体地讲,通过在一种或多种的烷基胺和多种亲核物质的存在下、在碱性条件和高温下在有机溶剂中同时破碎和选择性地萃取木质素,制备预处理的生物质。然后,可对预处理的生物质中所剩余的富集碳水化合物的固体进行酶解糖化以获得可发酵的糖,可进一步加工上述可发酵的糖以生产目标产物。

[0003] 发明背景

[0004] 纤维质的和木质纤维质的原料以及垃圾例如农业残余物、木材、林业垃圾、来自造纸业的淤渣、和市政及工业固体垃圾提供了潜力巨大的可再生原料,用于生产化学品、塑料、燃料和饲料。一般通过多种化学、机械和酶方法处理由纤维素、半纤维素、果胶和木质素组成的纤维质的和木质纤维质的原料和垃圾以释放主要的己糖和戊糖,然后上述己糖和戊糖能被发酵为有用产物。

[0005] 预处理方法经常被用于使木质纤维质生物质的多糖更容易被纤维素分解酶处理。纤维素分解酶消化的一个主要障碍是木质素的存在,木质素是限制上述酶接近它们的底物的障碍物,并且构成上述酶与之无效地结合的表面。由于与酶解糖化相关联的显著损失,希望通过钝化木质素对酶的吸附或直接萃取出木质素使酶载量最小化。另一个挑战是由于半纤维素和木质素对纤维素的保护或由于纤维素的结晶度导致的酶水解对纤维素的难以接近性。尝试用以克服这些挑战的预处理方法包括:蒸汽爆裂、热水、稀酸、氨纤维爆裂、碱水解(包括氨回收过滤)、氧化脱木质素和有机溶剂(organosolv)。

[0006] 就纸浆的生产或生物燃料的应用而言,有机溶剂方法此前已应用于木质纤维质生物质的处理,尽管在木质素的去除方面通常是成功的,有机溶剂方法有着糖(尤其是木糖)回收低下的问题。例如,在高温下使用略微酸性的乙醇-水混合物(例如,EtOH 42 重量%)从木质纤维质生物质中除去木质素(Kleinert, T. N., Tappi, 57 :99-102, 1974)导致了碳水化合物的大量损失。在 95°C 进行稀酸水解,然后进行有机溶剂萃取和酶解糖化(Lee, Y-H. 等人, Biotech. Bioeng., 29 :572-581, 1987)导致了水解时半纤维素的大量损失、有机溶剂萃取时碳水化合物的进一步损失和残留物酶解糖化时的低收率(总碳水化合物的~ 50%)。在高温下使用包含氨的含水有机溶剂处理木质纤维质生物质(Park J. -K. 和 Phillips, J. A., Chem. Eng. Comm. 65 :187-205, 1988)需要在预处理中使用高的液体对固体比率,并且导致半纤维素的大量损失和纤维素的酶解糖化不良。用气态水和甲胺处理生物质,然后用有机溶剂萃取并继之以用水萃取,需要三个步骤并且导致碳水化合物的大量损失(Siegfried, P. 和 Götz, R., Chem. Eng. Technol., 15 :213-217, 1992)。在水-脂肪醇混合物中用多胺或乙胺处理加上在高温下催化,需要高的液体/固体比率,并且低浓度的醇导致糖(尤其是木聚糖)的回收低下(美国专利 4, 597, 830A)。使用含水碱性溶液中的

巯基乙酸盐在高温下处理木质纤维质生物质,然后用热水洗涤,需要使用碱金属或碱土氢氧化物。该方法需要费用高昂的无机离子处理、高重量%的巯基乙酸盐、和大量水的使用(美国专利 3,490,993)。在高温下在硫化物/二硫化物的存在下用有机溶剂-水混合物处理需要高的溶剂/固体比率和高的含硫量并且导致了碳水化合物的大量损失(美国专利 4,329,200)。

[0007] 此前应用的方法的更多缺点包括:分开的己糖和戊糖流(例如,稀酸);木质素萃取不充分或不能将萃取的木质素从多糖中分离,尤其是在具有高木质素含量的那些原料中(例如,蔗渣、软木);废弃产物的处理(例如,酸或碱中和时形成的盐);以及由于分解或在洗涤步骤中的损失导致的碳水化合物回收低下。其他问题包括耗能、资本设备和预处理催化剂回收的高成本,以及与糖化酶的不相容。

[0008] 生物质预处理的主要挑战之一,是通过低成本、有效率的方法,使木质素的萃取或化学中和(针对纤维素分解酶的无效结合)最大化,同时使碳水化合物(纤维素加上半纤维素)的损失最小化。选择性越高,联合的预处理和酶解糖化之后单体糖的总收率就越高。

[0009] 在本公开中,在高性价比的方法中,使用有机溶剂介导的破碎和在高温、碱性条件下结合使用一种或多种烷基胺以及任选的多种亲核物质的对木质素的选择性萃取,来生产富集碳水化合物的、对酶解糖化高度敏感的生物物质,产生非常高收率的、用于向目标产物(例如,增值的化学品和燃料)的生物转化的可发酵糖(葡萄糖,以及木糖)。令人吃惊地,烷基胺在本公开中的使用导致了木质素破碎和萃取的显著改善和碳水化合物的高保留。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了用于生产易于糖化的富集碳水化合物的生物物质和用于从木质纤维质生物质中选择性地萃取木质素同时接近完全量地保留了碳水化合物的方法。所述方法包括在单一步骤中,在高温、碱性条件下用有机溶剂溶液,例如有机溶剂,和一种或多种烷基胺处理木质纤维质生物质。在某些实施方案中,所述溶剂溶液还包含附加的亲核组分,例如氨、硫醇、和硫化物。预处理之后,可进一步用糖化酶聚生体处理所述生物物质以生产可发酵的糖。这些糖可被呈递至用于生产目标产物的进一步的加工。

[0012] 因此,本发明提供了用于生产富集碳水化合物的生物物质的方法,所述方法包括:

[0013] (a) 提供包含木质素的木质纤维质生物物质;

[0014] (b) 在碱性条件下将(a)的生物物质悬浮于包含水和一种或多种烷基胺的有机溶剂溶液中,从而形成生物物质-溶剂悬浮液;

[0015] (c) 将所述生物物质-溶剂悬浮液加热至约 100°C 至约 220°C 的温度约 5 分钟至约 5 小时,从而木质素被破碎并溶解于所述悬浮液中;以及

[0016] (d) 过滤自由液体,从而溶解的木质素被除去,并且从而生产了富集碳水化合物的生物物质。

[0017] 尤其适合的烷基胺包括选自下列的那些: $R-NH_2$, R_2-NH , R_3N , $(H_2N-R-NH_2)$, $(H_2N-R(NH_2)_2)$, $(HO-R-NH_2)$, $((HO)_2-R-NH_2)$, $(HO-R-(NH_2)_2)$, $(HS-R-NH_2)$, $((HS)_2-R-NH_2)$, $(HS-R-(NH_2)_2)$ 和 $(H_2N-R(OH)(SH))$ 以及它们的组合,其中 R 独立地为一价、二价或三价的、1-6 个碳的直链的、环状的或支链的烷烃、烯烃或炔烃。

[0018] 尤其适合用于本发明的方法中的原料包括但不限于柳枝稷、废纸、来自造纸业的淤渣、玉米纤维、玉米芯、玉米壳、玉米秸秆、草、小麦、小麦秸秆、干草、大麦、大麦秸秆、稻

秆、蔗渣、甘蔗秸秆、黄杨、高粱、大豆、得自谷物加工过程的组分、树、树枝、根、叶、木屑、锯末、灌木和灌丛、蔬菜、水果、花、动物粪肥以及它们的组合。

[0019] 在另一个实施方案中,本发明提供了同时破碎和从木质纤维质生物质中选择性地萃取木质素以生产基本上不含木质素的生物质的方法,所述方法包括以下步骤:

[0020] (a) 提供:

[0021] 1) 一定量的木质纤维质生物质;

[0022] 2) 多组分的溶剂溶液,所述溶液在水中包含约 40%至约 70%的乙醇;和

[0023] 3) 碱性条件下的一种或多种烷基胺;

[0024] (b) 使所述生物质与 (a) 的多组分溶剂溶液接触,以形成溶剂-生物质混合物;

[0025] (c) 将所述溶剂-生物质混合物置于密封的压力容器中,由此将 (b) 的混合物在约 100°C至约 220°C的温度加热约 5 分钟至约 5 小时,从而木质素被破碎并溶解于所述溶剂中;以及

[0026] (d) 通过过滤除去 (c) 的溶解的木质素,以及

[0027] (e) 用有机溶剂洗涤残余的生物质,从而生产了基本上不含木质素的生物质。

[0028] 附图简述

[0029] 图 1A 和 1B- 图 1A(葡萄糖单体)和图 1B(木糖单体)显示在溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 和 14%甲胺 (w/w 生物质)、含有或不含 2%巯基乙酸盐 (w/w 生物质) 的溶液中和于 187°C预处理 1 小时之后,在 1%吐温 20 (w/v) 的存在和不存在下的酶解糖化的时间进程。

[0030] 图 2A 和 2B- 图 2A 显示在溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 加上 14%甲胺 (w/w 生物质) 的溶液中和除了 14%甲胺 (w/w 生物质) 还加上了 2%巯基乙酸 (w/w 生物质) 的溶液中,以及在溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 加上 14%乙胺 (w/w 生物质) 的溶液中和除了 14%乙胺 (w/w 生物质) 还加上了 2%巯基乙酸 (w/w 生物质) 的溶液中,于 187°C预处理 1 小时之后,滤液(用溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 按 1 : 5000 稀释)的 UV 吸收光谱。图 2B 显示在溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 加上 14%甲胺 (w/w 生物质) 的溶液中和除了 14%甲胺 (w/w 生物质) 还加上了 2%乙醇酸 (w/w 生物质) 或 2%甘氨酸 (w/w 生物质) 的溶液中,于 187°C预处理之后,滤液(用溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 按 1 : 5000 稀释)的 UV 吸收光谱。

[0031] 图 3A 和 3B- 图 3A 显示在溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 加上 14%甲胺 (w/w 生物质)、含有或不含 2%或 6% (NH₄)₂S(w/w 生物质) 的溶液中,于 187°C预处理 1 小时之后,滤液(用溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 按 1 : 5000 稀释)的 UV 吸收光谱。图 3B 显示%在溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 加上 14%甲胺 (w/w 生物质)、含有或不含 2%元素硫 (w/w 生物质) 的溶液中,于 187°C预处理 1 小时之后,滤液(用溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 按 1 : 5000 稀释)的 UV 吸收光谱。

[0032] 发明详述

[0033] 申请人特别在本公开中加入了所有引用的参考文献的全部内容。除非另行指出,所有百分数、份数、比率等均按重量计。商标以大写体标示。此外,当数量、浓度或其他数值或参数以范围、优选范围或优选上限数值和优选下限数值的列表形式给出时,它应理解为具体地公开由任何范围上限或优选数值和任何范围下限或优选数值的任何一对所构成的所有范围,而不管所述范围是否被单独地公开。凡在本文中给出某一数值范围之处,该范围

均旨在包含其端点,以及位于该范围内的所有整数和分数,除非另行指出。当定义一个范围时,不旨在将本发明的范围限定于所列举的具体值。

[0034] 本发明提供了用于处理生物质,以生产易于糖化的富集碳水化合物的生物质,从而增强后续的酶解糖化步骤,使得能够从糖化中获得易于发酵的糖的方法。

[0035] 采用了涉及预处理步骤的方法,其中在一种或多种烷基胺的存在下,在高温、碱性条件下使用有机溶剂,木质素被破碎的同时被萃取。可使用附加的亲核物质以获得进一步的有益效果。然后,经过处理的生物质被过滤和洗涤,以除去溶解的木质素、乙酸、乙酰胺、烷基酰胺和多余的试剂,然后用糖化酶聚生体对其进行消化,以生产易于发酵的糖。所述糖可被进一步加工为一种或多种目标产物。被移除的木质素也可出于其他目的(例如燃烧以产能)被进一步加工和利用以提高效率。

[0036] 定义

[0037] 在本公开中使用了下列定义:

[0038] “室温”和“环境温度”当被用于指温度时,是指约 15°C 至约 25°C 的任何温度。

[0039] “可发酵的糖”是指主要包含能够在发酵过程中被微生物(可能存在某些多糖)用作碳源以生产目标产物的单糖和一些二糖的糖成分。“易于发酵的糖”意指不需要额外的费用高昂的加工和/或发酵微生物能在来自抑制剂或可不利地影响发酵的其他组分的障碍最小化的情况下与所得到的糖接触。

[0040] “木质纤维质”是指既包含木质素又包含纤维素的材料。木质纤维质材料也可包含半纤维素。在本文所述的方法中,木质素被溶解并被从木质纤维质生物质中基本上除去,以生产富集碳水化合物的生物质。

[0041] 本文提及“溶解的木质素”时是指溶解于有机溶剂溶液的木质素。

[0042] “AI 木质素”是指酸不溶的木质素。

[0043] “自动水解”是指生物质在存在溶剂(水,或者有机溶剂加上水)和高温,而没有进一步的添加物,例如没有外源的酸或碱或水解酶添加物时的水解。

[0044] “纤维质”是指包含纤维素的组合物。

[0045] “目标产物”是指通过发酵生产的化学品、燃料或化学品基础材料。产物按广义使用,并且包括分子如蛋白质,包括例如肽、酶和抗体。预期乙醇和丁醇也包括在目标产物的定义之内。

[0046] “生物质的干重”是指移除全部的或基本上全部的水分后的生物质的重量。干重通常依照美国材料与试验协会 (ASTM) 标准 E1756-01 (Standard Test Method for Determination of Total Solids in Biomass) 或纸浆与造纸工业技术协会, Inc. (TAPPI) 标准 T-412 om-02 (Moisture in Pulp, Paper and Paperboard) 进行测量。

[0047] “选择性的萃取”是指移除木质素的同时基本上保留了碳水化合物。

[0048] “溶剂溶液”和“有机溶剂溶液”,如本文所用,是指水中的有机溶剂混合物,包括溶解固态、液态、或气态的溶质从而得到溶液的任何有机液体。就本发明而言,最适合的溶剂溶液是有机溶剂,例如乙醇、甲醇、正-丙醇、异丙醇、正丁醇、2-丁醇、异丁醇、叔丁醇、戊醇和己醇以及具有相同碳原子数的二醇。它们还可包括非质子溶剂。溶剂溶液在含有所述溶液的混合物中可包括附加组分,例如溶剂溶液可包括一种或多种亲核物质。

[0049] 如本文所用,“生物质”和“木质纤维质生物质”是指任何木质纤维质材料,包括纤

维质的和半纤维质的材料,例如生物能作物、农业残余物、市政固体垃圾、工业固体垃圾、庭院垃圾、木材、林业垃圾以及它们的组合,并且如下文所详述的。生物质具有包括多糖和低聚糖的碳水化合物成分,并且还可包含附加组分,例如蛋白质和 / 或脂质。

[0050] 如本文所用,“高度保留”是指本文所述的加工步骤之后的木质纤维质材料的碳水化合物成分。在本发明的一个实施方案中,高度保留的碳水化合物成分提供糖化后的糖产量,来自本文所述的方法的糖产量具有最低限度糖产量损失、基本上类似于理论产量。在本发明的一个实施方案中,“高度保留的”当被用于指碳水化合物成分时,是指与如本文所述的预处理之前的生物质相比,生物质碳水化合物大于或等于 85% 的保留。

[0051] 如本文所用,“预加工”是指在预处理之前对木质纤维质生物质的加工。预加工是使生物质适合进行预处理的任何处理,例如机械碾磨和 / 或干燥至适当的水份。

[0052] “生物质 - 溶剂悬浮液”是指生物质和溶剂的混合物。生物质 - 溶剂溶液可包含附加组分,例如烷基胺、巯基乙酸盐、氨、硫化物等。

[0053] “糖化”是指通过水解酶的作用,主要地从多糖生产可发酵的糖。可发酵的糖从经过预处理的生物质的生产,通过由纤维素分解酶和半纤维素分解酶的作用的酶解糖化而实现。

[0054] 如本文所用,“预处理的生物质”或“生物质预处理”是指在糖化之前使天然的或经过预加工的生物质受化学的或物理的、或者它们的任何组合的作用,使得所述生物质对酶解糖化或其他的水解方法更加敏感。例如,本文所主张的方法可被称为有助于使得生物质对用于糖化的水解酶更加敏感的预处理方法。

[0055] “预处理滤液”意指预处理之后与生物质接触并且通过过滤被分离的自由液体。

[0056] 如本文所用,“经过预处理的生物质”是指在糖化之前已受过化学的、物理的或生物的、或者它们的任何组合的作用,使得所述生物质对酶解糖化或其他的水解方法更加敏感的天然的或经过预加工的生物质。

[0057] “空气干燥经过滤的生物质”可通过允许生物质干燥而进行,其中所述干燥通过与环境空气的平衡实现。

[0058] “易于糖化的生物质”意指富集碳水化合物并且变得更加适合被纤维素分解酶或半纤维素分解酶水解,以生产单体的和低聚的糖的生物质,即如本文所述的经过预处理的生物质。

[0059] 如本文所用,“富集碳水化合物的”是指通过本文所述的处理方法生产的生物质。在一个实施方案中,通过本文所述的方法生产的易于糖化的富集碳水化合物的生物质,具有按重量计大于或等于干燥生物质的 85% 的碳水化合物浓度,同时已移除了按干重计 75% 或更多的初始生物质木质素含量。

[0060] “加热生物质悬浮液”意指将悬浮于溶剂中的生物质置于高于环境温度或室温的温度。与本文的预处理有关的温度为约 100 至约 220°C、或约 140 至约 180°C、或者这些范围内或接近这些范围的任何温度。

[0061] “在压力下过滤自由液体”意指在过滤器的对立表面具有一些压力差的情况下,通过过滤移除未受束缚的液体。

[0062] “碱性的”或“在碱性条件下”意指大于 7.0 的 pH。在本发明中,“在碱性条件下”也指等于或大于所存在的亲核物质的 pKa 的生物质 - 溶剂悬浮液的 pH,所述悬浮液从而被充

分去质子化并且比处于质子化的状态时具有更高的反应性。这些亲核物质将包括烷基胺、氨、硫醇、多硫化物和氢硫化物（如果存在）。

[0063] “二价烷烃”意指具有两个开放的化合价的直链的、支链的或环状的烷烃。

[0064] “烷基胺”意指包含取代了一个、两个或三个 H 原子的 $-NH_2$ 基的烷烃；例如一甲胺，二甲胺、三甲胺、乙胺、异丙胺、乙基己胺、环己胺，并且如下文所进一步定义的。

[0065] “空气干燥的样品”意指经过预处理的样品，其已被允许在环境温度和压力下空气干燥至其含水量与环境空气的含水量平衡的状态，典型地为 $\geq 85\%$ 的干物质。

[0066] “基本上不含木质素的生物质”意指约 $\geq 75\%$ 的木质素被除去的经过预处理的样品。

[0067] “干燥生物质”意指具有 $\geq 85\%$ 的干物质含量的生物质。使生物质干燥的方法包括在环境温度暴露于真空或处于大气压的空气流，和 / 或在烘箱或真空烘箱中加热。

[0068] “多组分溶剂”意指溶剂包含有机溶剂、水和能对木质素进行化学侵蚀的试剂。

[0069] “压力容器”是可以装配有或未装配用于搅拌生物质 / 溶剂悬浮液的机械装置的密封的容器，当加热木质纤维质生物质时，在其内部出现正压力。

[0070] “亲核物质”是能够通过提供双方的键电子而与其反应伙伴形成共价键的化学试剂。

[0071] “水解产物”是指与木质纤维质生物质相接触的液体，其包含作用于所述生物质的水解反应（酶促的或非酶促的）的产物，在本案中即单体的和低聚的糖。

[0072] “有机溶剂 (organosolv)”意指有机溶剂和水的混合物，其通常与生物质相接触，并且在其中木质素或其片段是可溶的。

[0073] “酶聚生体”或“糖化酶聚生体”是酶的集合，通常由微生物分泌，在本案中，其将通常包含一种或多种的纤维素酶、木聚糖酶、糖苷酶、木素酶和酯酶。

[0074] “单体糖”或“单糖”由单一的戊糖或己糖单元构成，例如葡萄糖、木糖和阿拉伯糖。

[0075] “脱木素”是从木质纤维质生物质中移除木质素的作用。在本专利申请的用语中，脱木素意指在高温、碱性条件下，在烷基胺和任选的多种亲核物质的存在下，利用有机溶剂使木质素破碎并从木质纤维质生物质中将其萃取。

[0076] “破碎”是在碱性条件下用有机溶剂处理木质纤维质生物质，使木质素分解为更小的子单元的过程。

[0077] “选择性的萃取”是通过在碱性条件下用有机溶剂处理，使破碎的木质素溶解而保留多糖的过程。

[0078] 如本文所用，“同时破碎和选择性萃取”是指在有机溶剂中进行破碎反应，使得木质素片段一从大块生物质中释放出来即进入溶液中。

[0079] 提供了用于预处理木质纤维质生物质，以生产易于糖化的生物质的方法。这些方法提供了用于使木质纤维质生物质的组分对酶解糖化更加敏感或更加适合的经济的工艺。预处理可以是化学的、物理的或生物的，或者是上述这些的任何组合。在本公开中，预处理在亲核物质的存在下进行，具体而言在碱性条件下在一种或多种烷基胺的存在下进行。还可存在附加的亲核物质，例如 NH_3 、硫醇、硫化物试剂、或它们的组合。有机溶剂和碱性条件的存在有助于木质素的破碎和移除以及碳水化合物的回收。

[0080] 此外，本公开中所述的方法使预处理过程中的碳水化合物损失最小化，并且使糖

化中的可溶解（单体的 + 低聚的）糖的收率最大化。

[0081] 如上文所公开的，本文所述的方法包括用包含下文所述的组分的溶剂溶液预处理木质纤维质材料，以生产易于糖化的富集碳水化合物的生物质。

[0082] 溶剂

[0083] 本文所述的方法包括用于预处理生物质，具体而言用于破碎和萃取木质素的有机溶剂的使用。在本发明的方法中有用的溶剂在本领域中经常被称为 Organosolv（例如，E. Muurinen(2000) Organosolv Pulping, A review and distillation study related to peroxyacid pulping Thesis, University of Oulu, pp. 314 ;S. Aziz, K. Sarkanen, Tappi J. , 72/73 :169-175, 1989 ;A. K. Varsheny 和 D. Patel, J. Sci. Ind. Res. , 47 :315-319, 1988 ; A. A. Shatalov 和 H. Pereira, BioResources 1 :45-61, 2006 ;T. N. Kleinert, Tappi J. , 57 : 99-102, 1979 ;用于生物燃料的 organosolv 技术的应用已被描述 (WO 20071051269)，其来源于 Kleinert, 已使用 EtOH/H₂O 推进至中试试验规模，和 X. Pan, N. Gilkes, J. Kadla, K. Pye, S. Saka, D. Gregg, K. Ehara, D. Xie, D. Lam, 和 J. Saddler, Biotechnol. Bioeng. , 94 :851-861, 2006。丙酮 /H₂O 的使用描述于美国专利 4,470,851 中，尽管还处于实验室规模。涉及溶剂的使用和其他预处理的关于预处理技术的更多细节可参见 Wyman 等人, (Bioresource Tech. , 96 :1959, 2005) ;Wyman 等人, (Bioresource Tech. , 96 :2026, 2005) ; Hsu, (Handbook on Bioethanol :Production and Utilization 中的“Pretreatment of biomass”, Wyman, Taylor 和 Francis 编辑, p. 179-212, 1996) ;和 Mosier 等人, (Bioresource Tech. , 96 :673, 2005)。溶剂在本文中被用于预处理生物质以移除木质素。脱木素通常在 165-225℃ 的温度、以 4 : 1 至 20 : 1 的液体对生物质比率、以 50% 有机溶剂 (v/v) 的液体组合物、和以 0.5-12 小时之间的反应时间进行。多种一元醇和多元醇已作为溶剂被测试。乙醇、丁醇和苯酚已被用于这些反应中 (Park, J. K. , 和 Phillips, J. A. , Chem. Eng. Comm. , 65 :187-205, 1988)。

[0084] 在本发明的方法中，有机溶剂 (organosolv) 或有机溶剂溶液预处理可包括在选择的条件参数下水和有机溶剂的混合物，所述条件参数包括温度、时间、压力、溶剂对水的比率和固体对液体的比率。溶剂可包括但不限于醇和非质子溶剂（溶剂不具有与氧结合的氢原子如在羟基中、或与氮结合的氢原子如在胺基中、或与硫结合的氢原子如在硫醇中，例如酮类）。醇可包括甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、戊醇和己醇以及它们的异构体，以及具有相同数量碳原子的二醇，例如 1,2- 乙二醇、1,2- 丙二醇、1,3- 丙二醇、1,3- 己二醇。

[0085] 在本发明中，溶液（例如水）中的溶剂的浓度为约 2% 至约 90% (v/v)、或约 10% 至约 85% 或约 20% 至约 80% 或约 30% 至约 80% 或更有选约 40% 至约 70% (v/v)。具体而言，出于本文的方法的一个实施方案的目的，测试了约 0% -80% (v/v) 乙醇浓度的 EtOH 在 H₂O 中的混合物，并且发现包含 40-70% (v/v) EtOH 的溶液是最有效的。

[0086] 烷基胺

[0087] 根据本发明的方法，烷基胺作为溶剂溶液的组分被用于预处理。烷基胺是低成本的材料，当被用于预处理生物质时有助于提供总体上经济的工艺。此外，烷基胺在预处理过程中可被回收利用，从而提高本发明的方法的效率和经济性。

[0088] 适用于本发明的烷基胺包括：甲胺 (MA)、二甲胺 (DMA)、三甲胺 (TMA)、乙胺、丙胺、和丁胺。就本发明而言，更加适合的烷基胺包括但不限于 MA 和 DMA。根据本发明的方法，烷

基胺的浓度可以是干燥生物物质的约 1 至约 20 重量%。

[0089] 本文所使用的烷基胺具有电子释放、空间和 H- 结合因素的组合,其中所述组合影响在质子极性溶剂中被取代的铵盐阳离子的稳定性,从而影响胺类的基本性质 (pKa),并影响它们作为亲核物质的活性。

[0090] 根据本发明的方法,意外发现了烷基胺,尤其是 MA 和 DMA,在相对于生物物质的干重从 10% 至 14% 范围的浓度是高度活性的。在该浓度范围内,有足够的烷基胺来保证溶剂溶液保持高的 pH 和保证烷基胺的浓度足以保证木质素随着预处理的进行持续的破碎。

[0091] 如本文所述的对生物物质的预处理过程中,烷基胺促进木质素的破碎,其机制可能包括对木质素芳基醚键的亲核攻击、对在碱性条件下形成的醌的甲基化物的 α - 位的亲核攻击、促进 β - 芳基醚键的断裂、或者随着 β - 芳基醚的消除使醌的甲基化物被还原。木质素向低分子量组分的这种破碎和这些片段在有机溶剂中的溶解,增强了多糖链向纤维素分解酶和半纤维素分解酶(例如纤维素酶和半纤维素酶)的暴露,以水解释放低聚的和单体的糖。

[0092] 烷基胺因由烷基链的碳向胺基氮的电子供给而是强碱,并且由伯胺 ($R-NH_2$)、仲胺 ($R-N-R'$) 和叔胺组成,其中 R 为烷基链。具体而言,R 选自一价、二价或三价的、1-6 个碳的直链的、环状的或支链的烷烃、烯烃或炔烃。烷基胺的实例包括:一、二和三甲胺,一、二和三乙胺,一、二和三丙胺,一、二和三丁胺。烷基胺包括一胺、二胺和三胺,醇胺 ($HO-R-NH_2$),二乙醇胺 ($(HO)_2-R-NH_2$),醇二胺 ($HO-R-(NH_2)_2$),硫胺 ($HS-R-NH_2$),二硫胺 ($(HS)_2-R-NH_2$),硫二胺 ($HS-R-(NH_2)_2$) 和醇硫胺 ($H_2N-R(OH)(SH)$),其中 R 是如上文所定义的。

[0093] 烷基胺还是强亲核物质,具有大约 9-11 的 pKa。例如,甲胺和二甲胺 (DMA) 的 pKa 分别是 10.62 和 10.64。因此选择了它们来研究它们对木质纤维质生物物质的作用。令人吃惊地,烷基胺在本发明的方法中的使用导致了木质素的破碎和萃取非常充分的改善。

[0094] 此外,烷基胺的使用改善了碳水化合物和最终糖的回收,烷基胺可通过形成亚胺(席夫碱)起到保护多糖链还原末端的作用,从而将糖在碱性 pH 下“剥落”的损失降低,并降低随后的糠醛和羟甲基糠醛的形成。

[0095] 此外,还观察到了随着溶剂溶液中乙醇(溶剂)浓度的提高,多糖回收的提高,这很可能反映了随着木糖低聚物在预处理滤液中溶解度的降低,葡聚糖和木聚糖在预处理过程中水解的降低。在本发明的方法中,随着包含一种或多种烷基胺的预处理溶液中乙醇浓度的提高,木质素提高的破碎和萃取很可能反映了烷基胺的未质子化形式的增加和木质素片段在逐渐减少的极性溶剂中溶解度的提高。

[0096] 溶剂溶液的附加组分

[0097] 根据本发明的方法,包含一种或多种烷基胺的溶剂溶液可任选地包含附加组分。附加组分可包括其他亲核物质如至少一种附加的(无机)碱,例如氢氧化钠、氨、碳酸钠、氢氧化钾、碳酸钾、氢氧化钙和碳酸钙。

[0098] 可加入一种或多种附加的碱,加入的量使其与烷基胺合并形成的总碱量相对于生物物质的干重小于约 20 重量%。优选地,附加的碱加上烷基胺的总的量为相对于生物物质的干重小于约 16%,或约 0%、2%、4%、6%、8%、10%、12%、14% 或 16%。所述一种或多种附加的碱可以至少从 0.5% 至约 16% 的多种浓度被使用。更加适合的是从 1% 至 10% 的浓度。最适合的是介于 2% 至 8% 之间的浓度。

[0099] 在一个实施方案中, NaOH 可在烷基胺的存在下被用作溶剂溶液的附加组分, 导致木质素破碎和萃取的提高, 并导致富集碳水化合物的生物质对酶解糖化的可接近性的提高。NaOH 可具体地用于 EtOH 在 H₂O 中的溶剂溶液。NaOH 的使用可包括向溶剂溶液中添加催化剂, 例如蒽醌, 以使木质素进一步破碎。

[0100] 在另一个实施方案中, 氨可在烷基胺的存在下被用作溶剂溶液的附加组分, 导致木质素破碎和萃取的提高, 并导致富集碳水化合物的生物质对酶解糖化的可接近性的提高。一个更加具体的实施方案是在溶剂溶液中使用氨和甲胺。一个方面包括在溶剂溶液中使用元素硫和氨, 所述溶剂溶液包含甲胺作为该溶剂溶液中的烷基胺。例如, 这样的溶剂溶液可包含 20-80% v/v 的溶于 H₂O 的 EtOH、1% 的元素硫、2% 至 16% 的 NH₃ (w/w 生物质) 和甲胺。

[0101] 在包含 70% 的溶于 H₂O 的 EtOH (v/v) 和 1% 的元素硫以及 14% 的甲胺 (二者均为 w/w 生物质) 的溶剂溶液中进行预处理之后, 观察到来自木质纤维质生物质的葡萄糖和木糖糖化收率。然而, 在 1% 元素硫 (w/w 生物质) 的存在下, 随着在 70% 的溶于 H₂O 的 EtOH 中用氨逐渐增加地替代甲胺, 导致了随后的酶解糖化时释放的单体糖的量的降低 (实施例 11)。

[0102] 在另一个实施方案中, 在烷基胺的存在下, 巯基乙酸盐被加入至溶剂溶液, 导致木质素破碎和萃取的提高, 并且相应地, 提高了易于糖化的生物质对酶解糖化的可接近性。在本发明中, 可使用从 0.5% 至 15% 的巯基乙醇酸盐浓度。更具体地讲, 1 至 3% 的浓度是更加有用的。就本发明而言, ~ 2% 的更加具体的浓度将是最有用的。

[0103] 在另一个实施方案中, 硫化铵在烷基胺的存在下被添加至溶剂溶液, 导致木质素破碎和萃取的提高, 并导致富集碳水化合物的生物质对酶解糖化的可接近性的提高。硫化物是良好的亲核物质和还原剂。此外, 硫化物可潜在地通过用 H₂S 喷吹或通过元素硫的歧化而在碱性有机溶剂溶液即预处理溶液中产生。在本发明中, 可使用从 0.5% 至 15% 的硫化铵浓度。更具体地讲, 1 至 6% 的浓度是更加有用的。就本发明而言, 2% 至 4% 的更加具体的浓度将是最有用的。

[0104] 在另一个实施方案中, 如上文所述, 元素硫在烷基胺的存在下被加入至溶剂溶液, 导致硫的溶解和歧化, 从而产生多硫化物、硫化物和氢硫化物。与使用硫化铵的情况一样, 这样的添加对预处理有利, 提高了木质素的破碎和萃取, 并导致易于糖化的生物质对酶解糖化的可接近性提高。在本发明中, 可使用从 0.05% 至 5% (w/w 生物质) 的元素硫浓度。更具体地讲, 0.5% 至 2% (w/w 生物质) 的浓度是更加有用的。就本发明而言, ~ 1% (w/w 生物质) 的更加具体的浓度将是最有用的。

[0105] 木质纤维质生物质

[0106] 本文中预处理的木质纤维质生物质包括但不限于, 生物能作物、农业残余物、市政固体垃圾、工业固体垃圾、来自造纸业的淤渣、庭园垃圾、木材和林业垃圾。生物质的实例包括但不限于: 玉米芯、作物残余 (如玉米壳、玉米秸秆)、草、小麦、小麦秸秆、大麦、大麦秸秆、干草、稻秆、柳枝稷、废纸、蔗渣、甘蔗秸秆、黄杨、高粱、大豆、获取自谷物粉的组分、树、树枝、根、叶、木屑、锯末、灌木和灌丛、蔬菜、水果、花和动物粪肥。

[0107] 在一个实施方案中, 所述木质纤维质生物质包括: 农业残余物, 例如玉米秸秆、小麦秸秆、大麦秸秆、燕麦秸秆、水稻秸秆、卡诺拉秸秆和大豆秸秆; 草, 例如柳枝稷、芒草、绳

草、和草芦；纤维加工残余物，例如玉米纤维、甜菜浆、纸浆厂的粉末和次品以及蔗渣；甘蔗秸秆和高粱；林业垃圾，例如黄杨、白杨木、其他硬木、软木和锯末；和消费后废纸；以及其他农作物或足够丰富的木质纤维质材料。

[0108] 在另一个实施方案中，对本发明有用的生物质包括具有相对较高碳水化合物含量的生物质，它们相对密集，和 / 或相对易于收集、运输、贮存和 / 或处理。

[0109] 在本发明的另一个实施方案中，有用的生物质包括玉米芯、玉米秸秆、蔗渣、黄杨和柳枝稷。

[0110] 木质纤维质生物质可来源于单一来源，或者可包括来源于一种以上来源的混合物；例如，生物质可包括玉米芯和玉米秸秆的混合物，或者秆或茎和叶的混合物。

[0111] 在本发明的方法中，在预处理过程中，生物质干重为占生物质 - 溶剂悬浮液重量的至少约 9% 至多约 80% 的初始浓度。更适当地，生物质的干重为占生物质 - 溶剂悬浮液重量的约 15% 至约 70%、15% 至约 60%、或约 15% 至约 50%。生物质在生物质 - 溶剂悬浮液中的百分比被维持在高水平，以减少预处理材料的总体积，降低所需的溶剂和试剂的量并使得所述方法更加经济。

[0112] 生物质从其来源获得之后可被直接使用，或者可对其进行某些预加工，例如可向生物质施加能量，以减小其尺寸、增加暴露的表面积、和 / 或在本发明方法的第二和第三步骤中分别提高所述生物质中存在的木质素和纤维素、半纤维素、和 / 或低聚糖对有机溶剂预处理和对所使用的糖化酶的可接近性。用于减小尺寸、增加暴露的表面积、和 / 或提高生物质中存在的木质素和纤维素、半纤维素、和 / 或低聚糖对有机溶剂预处理和对所使用的糖化酶的可接近性的能量方法包括但不限于研磨、压碎、碾磨、切碎、剁碎、盘磨、超声波、和微波。这种能量的施加可发生于预处理之前或期间，糖化之前或期间，或它们的任何组合。

[0113] 预处理之前的干燥同样可通过常规方法进行，例如在环境温度暴露于真空或处于大气压的空气流，和 / 或在处于大气压的烘箱或真空烘箱中加热。

[0114] 预处理条件

[0115] 用包含一种或多种烷基胺的溶剂溶液对生物质的预处理在任何适合的容器内进行。通常该容器是能耐压的容器，具有加热机构和混合内容物的机构。可商购获得的容器包括，例如 Zipperclave® 反应器 (Autoclave Engineers, Erie, PA)、Jaygo 反应器 (Jaygo Manufacturing, Inc., Mahwah, NJ 所述)、和蒸汽喷射反应器（如一般方法所述；Autoclave Engineers, Erie, PA）。可使用具有相似能力的更大型反应器。作为另外一种选择，生物质和有机溶剂溶液可在一个容器中合并，然后转移到另一个反应器中。生物质也可以在一个容器中进行预处理，然后在另一个反应器如蒸汽喷射反应器（如一般方法所述；Autoclave Engineers, Erie, PA）中进行进一步处理。

[0116] 可在任何合适的容器中进行预处理反应，例如分批反应器或连续反应器。本领域的技术人员将认识到，在更高温度下（超过 100℃）将需要压力容器。适合的容器可配备如叶轮的装置，以用于搅拌生物质 - 有机溶剂混合物。反应器设计在 Lin, K. -H., 和 Van Ness, H. C. (在 Perry, R. H. 和 Chilton, C. H. (eds), Chemical Engineer's Handbook, 第 5 版 (1973) Chapter 4, McGraw-Hill, NY 中) 中进行了讨论。预处理反应既可作为分批方法也可作为连续方法进行。

[0117] 在使生物质接触溶剂之前，可对包含生物质的容器施加真空。通过从生物质的孔

中抽出空气,可使溶剂更好地渗透到生物质中。施加真空的时间和施加到生物质上的负压的量将取决于生物质类型,并且能根据经验进行测定,以获得最佳的生物质预处理效果(通过糖化后可发酵糖的产量进行测量)。

[0118] 对生物质和溶剂的加热在约 100°C 至约 220°C、约 150°C 至 200°C、或约 165°C 至约 195°C 的温度进行。可使加热后的溶液迅速地冷却至室温。在另一个实施方案中,对生物质的加热在约 180°C 的温度进行。对生物质-溶剂悬浮液的加热可进行约 5 分钟至约 5 小时,或约 30 分钟至约 3 小时,或者更优选约 1 至 2 小时。

[0119] 用溶剂溶液和一种或多种烷基胺对生物质的预处理在碱性条件下进行,所述碱性条件的 pH 等于或大于所存在的亲核物质的 pKa。去质子化通常提高亲核物质的反应性。在烷基胺之外,所存在的亲核物质可包括氨、硫醇、多硫化物、或氢硫化物。

[0120] 就本文所述的预处理方法而言,预处理的温度、pH 和时间,和反应物如有机溶剂和烷基胺的溶液的浓度,以及一种或多种附加试剂的浓度、生物质浓度、生物质类型和生物质粒度是相关的;因此就每种类型的生物质而言,必要时可调整这些变量,以使本文所述的预处理过程最优化。

[0121] 在高温下进行预处理之后,生物质在压力下被过滤。过滤既可以是在冷却之后进行也可以不是。过滤之后,可以用含水的有机溶剂在高温或室温下洗涤生物质一次或多次。然后用水洗涤或干燥除去有机溶剂,然后使其糖化。使生物质干燥的方法包括在环境温度暴露于真空或处于大气压的空气流,和/或在处于大气压的烘箱或真空烘箱中加热,如本文中更加完整地描述的。

[0122] 为了评价预处理的效果,即易于糖化的富集碳水化合物的生物质的生产和随后的糖化,分别地或共同地,可测定来源于起始生物质的糖的理论收率并与经过测量的收率进行比较。可通过关联出酶用量是如何影响目标产物收率的,而就总体体系的效果对预处理效果进行进一步的评价。

[0123] 进一步的处理

[0124] 糖化

[0125] 预处理之后,易于糖化的富集碳水化合物的生物质包含:有机溶剂、所述一种或多种烷基胺和该溶剂溶液的任何附加组分如巯基乙酸盐或氨的混合物;经过破碎和萃取的木质素;以及多糖。在进一步处理之前,可通过过滤和用溶于 H₂O(0% 至 100% EtOH v/v) 的 EtOH 或水洗涤样品,从经过预处理的生物质中移除所述一种或多种烷基胺和/或附加的溶剂组分如巯基乙酸盐或氨以及木质素片段。可用水洗涤生物质以除去 EtOH 或干燥生物质,得到富集碳水化合物的、易于糖化的生物质,并且可使用本领域中熟知的分析方法测定所述生物质的葡聚糖、木聚糖和酸不溶的木质素内容物的浓度。经过预处理的生物质既可用洗涤也可被干燥以进行糖化,这是本发明的一项切实有益效果。然后可以在糖化酶聚生体的存在下进一步水解所述易于糖化的生物质,以在水解产物中释放低聚糖和/或单糖。

[0126] 可加入表面活性剂,例如 Tween 20 或 Tween 80 或聚氧乙烯如 PEG 2000、4000 或 8000,以改善糖化过程(美国专利 7,354,743 B2,以引用方式并入本文)。酶解糖化中表面活性剂(例如 Tween 20)的添加经常提高单体糖释放的速率和收率。很可能表面活性剂包被了任何残余的木质素,降低了酶对木质素的无效的结合。供选择的替代途径是在预处理中加强木质素的萃取,或者对木质素进行化学修饰,使得更少的酶因木质素的吸附而损失。

[0127] 用于生物质处理的糖化酶和方法参见 Lynd, L. R. 等人, (Microbiol. Mol. Biol. Rev. ,66 :506-577,2002)。糖化酶聚生体可包含一种或多种糖苷酶;所述糖苷酶可选自纤维素水解糖苷酶、半纤维素水解糖苷酶、和淀粉水解糖苷酶。糖化酶聚生体中的其他酶可包括肽酶、脂肪酶、木素酶和酯酶。

[0128] 糖化酶聚生体包括一种或多种酶,所述酶主要选自但不限于:“糖苷酶”类,所述酶水解二糖、低聚糖、和多糖的醚键,存在于广义“水解酶”(EC 3.) 的分类酶 EC 3.2.1.x 中 (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, CA with Supplement 1(1993), Supplement 2(1994), Supplement 3(1995), Supplement 4(1997) 和 Supplement 5[分别在 Eur. J. Biochem. ,223 :1-5,1994 ;Eur. J. Biochem. ,232 :1-6,1995 ;Eur. J. Biochem. ,237 :1-5,1996 ;Eur. J. Biochem. ,250 :1-6,1997 ;和 Eur. J. Biochem. ,264 :610-650,1999])。本发明的方法中可用的糖苷酶能根据它们水解的生物物质组分进行分类。本发明的方法可用的糖苷酶包括纤维素水解糖苷酶(例如,纤维素酶、内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、 β -葡萄糖苷酶)、半纤维素水解糖苷酶(例如,木聚糖酶、内木聚糖酶、外木聚糖酶、 β -木聚糖苷酶、阿拉伯糖基木聚糖酶、甘露聚糖酶、半乳糖酶、果胶酶、葡糖醛酸酶)、和淀粉水解糖苷酶(例如,淀粉酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶、异淀粉酶)。此外,它可用于将其他活性加入糖化酶聚生体中,如肽酶 (EC 3.4.x.y)、脂肪酶 (EC 3.1.1.x 和 3.1.4.x)、木素酶 (EC 1.11.1.x)、和阿魏酸酯酶 (EC 3.1.1.73),以帮助从生物物质的其他组分中释放多糖。本领域熟知生产多糖水解酶的微生物常常表现出某种活性,如纤维素降解,该活性由若干种酶或一组具有不同底物特异性的酶催化。因此,来自微生物的“纤维素酶”可包括一组酶,所有酶可有助于纤维素降解活性。取决于获取酶时利用的纯化方案,商业或非商业酶制剂,如纤维素酶,可包括多种酶。因此,本发明方法的糖化酶聚生体可包括酶活性,如“纤维素酶”,然而人们认识到该活性可被一种以上的酶催化。

[0129] 糖化酶可以以分离的形式商购获得,例如 Spezyme[®] CP 纤维素酶 (Genencor International, Rochester, NY) 和 Multifect[®] 木聚糖酶 (Genencor)。此外,在生物燃料工厂,糖化酶可在宿主微生物中被表达,包括使用重组的微生物。

[0130] 本领域的技术人员将懂得如何测定在复合酶中使用的酶的有效量,以及如何调节条件以获得最佳酶活性。本领域的技术人员也将懂得如何优化在复合酶中的此类酶的所需活性,以在选择条件下获得给定预处理产物的最佳糖化效果。

[0131] 优选地,糖化反应在糖化酶的最佳温度和 pH 下或接近此最佳 pH 和温度的条件下进行。在本发明的方法中糖化酶聚生体使用的最佳温度在约 15°C 至约 100°C 的范围内。在另一个实施方案中,温度的最佳范围为约 20°C 至约 80°C,并且最典型地为 45-50°C。最佳的 pH 可以是约 2 至约 11 范围。在另一个实施方案中,在本发明的方法中伴随糖化酶聚生体使用的最佳的 pH 是约 4 至约 5.5 范围。

[0132] 糖化可进行约几分钟至约 120 小时,优选约几分钟至约 48 小时。反应时间将取决于酶浓度和比活性,以及所使用的底物、底物的浓度(即固相含量)和环境条件如温度和 pH。本领域的技术人员能够容易地决定特定底物和糖化酶聚生体使用的温度、pH 和时间的最佳条件。

[0133] 糖化能分批进行或以连续方法进行。糖化也能一步进行或多步进行。例如,糖化所需的不同的酶可表现出不同的最佳 pH 或温度。能用酶在某个温度和 pH 下进行首次处理,

随后使用不同酶在不同温度和 / 或 pH 下进行第二次或第三次 (或更多次) 处理。此外,用不同酶在连续步骤中进行的处理可以在相同 pH 和 / 或温度下进行,或在不同 pH 和温度下进行,例如使用在更高 pH 和温度下稳定的和活性更高的半纤维素酶处理,随后用在更低 pH 和温度下有活性的纤维素酶处理。

[0134] 糖化后来自生物质的糖的溶解度能通过测量释放的单糖和低聚糖进行监控。测量单糖和低聚糖的方法是本领域熟知的。例如,还原糖的浓度可使用 1,3- 二硝基水杨酸 (DNS) 检测分析法 (Miller, G. L., Anal. Chem., 31 :426-428, 1959) 测定。作为另外一种选择,可使用适当的柱,通过 HPLC 测定糖,如下文所述。

[0135] 发酵生成目标产物

[0136] 如上文所述,可以用酶水解通过本发明的方法生产的易于糖化的生物质,以生产可发酵的糖,然后所述可发酵的糖能够被发酵成为目标产物。“发酵”是指任何发酵过程或包含发酵步骤的任何过程。目标产物包括但不限于:醇(例如,阿拉伯糖醇、丁醇、乙醇、甘油、甲醇、1,3-丙二醇、山梨醇、和木糖醇);有机酸(例如,乙酸、醋酮酸、己二酸、抗坏血酸、柠檬酸、2,5-二酮基-D-葡萄糖酸、甲酸、富马酸、葡糖二酸、葡萄糖酸、葡糖醛酸、戊二酸、3-羟基丙酸、衣康酸、乳酸、苹果酸、丙二酸、草酸、丙酸、琥珀酸、和木糖酸);酮类(例如,丙酮);氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、赖氨酸、丝氨酸、和苏氨酸);气体(例如,甲烷、氢气 (H₂)、二氧化碳 (CO₂)、和一氧化碳 (CO))。

[0137] 发酵过程还包括在酒精消费品工业(例如,啤酒和酒)、乳品工业(例如,发酵的乳制品)、皮革工业、和烟草工业中所使用的工艺。

[0138] 进一步来讲,产生自对如本文所述的经过预处理的生物质的糖化的糖,一般而言可被用于生产:有机产品,化学品,燃料,商品和专用化学品如木糖、丙酮、乙酸盐、甘氨酸、赖氨酸、有机酸(例如乳酸)、1,3-丙二醇、丁二醇、甘油、1,2-乙二醇、糠醛、聚羟基链烷酸酯、顺,顺-粘康酸,以及动物饲料 (Lynd, L. R., Wyman, C. E., 和 Gerngross, T. U., Biocom. Eng., Biotechnol. Prog., 15 :777-793, 1999; 和 Philippidis, G. P., Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol :Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, D. C., 179-212, 1996; 和 Ryu, D. D. Y., 和 Mandels, M., Cellulases :biosynthesis and applications, Enz. Microb. Technol., 2 :91-102, 1980)。

[0139] 潜在的协同生产的产品也可被生产,例如来自可发酵的碳水化合物的多种有机产品。预处理和发酵之后剩余的富含木质素的残余物能被转化为源自木质素的化学品、化学品基础材料或被用于能源生产。

[0140] 发酵和 / 或糖化的常规方法是本领域已知的,包括但不限于糖化、发酵、分步水解和发酵 (SHF)、同步糖化和发酵 (SSF)、同步糖化和共发酵 (SSCF)、混合糖化和发酵 (HHF)、以及直接微生物转化 (DMC)。

[0141] SHF 采用分别的工序来首先将纤维素酶解为糖如葡萄糖和木糖,然后将所述糖发酵为乙醇。在 SSF 中,纤维素的酶水解和葡萄糖向乙醇的发酵被合并为一个步骤 (Philippidis, G. P., 同上文)。SSCF 包括多种糖的共发酵 (Sheehan, J., 和 Himmel, M., Biotechnol. Prog. 15 :817-827, 1999)。HHF 包括在同一反应器但在不同温度进行的两个分别的步骤,即在高温下进行酶解糖化,然后在发酵菌株能够耐受的较低温度进行 SSF。

DMC 将全部三个过程（纤维素酶生产、纤维素水解、和发酵）合并为一个步骤（Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., 和 Pretorius, I. S., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66 :506-577, 2002）。

[0142] 这些方法可被用于从通过本文所述的预处理方法生产的易于糖化的生物质生产目标产物。

[0143] 本发明的方法的优点

[0144] 本发明所述的对木质纤维质生物质进行预处理的方法，利用在高温、碱性条件下结合一种或多种烷基胺和多种亲核物质对木质素的破碎和选择性萃取，提供了获得用于酶解糖化的富集碳水化合物的生物质的性价比方法。然后，此类生物质产生非常高收率的可发酵糖（葡萄糖，以及木糖），这些糖用于通过生物转化成为增值的化学品和燃料。

[0145] 文献中描述的现有的有机溶剂方法的弱点包括：预处理之后碳水化合物尤其是木糖的回收不良，分离己糖和戊糖流的需求，糖分解产品的生产，大量溶剂的使用以及高的资本成本。例如，某些现有的方法包括使用酸性的有机溶剂条件和生产半纤维素和纤维素的水解产物。半纤维素在酸性条件下较高的不稳定性导致单体木糖的分解产物（例如糠醛）的形成，极大地降低了木糖的回收（Pan 等人，参见上文）。在该方法的一个版本中（Arato, C., Pye, E. K., 和 Gjennestad, G., *Appl. Biochem. Biotech.* 121-124 :871-882, 2005），半纤维素在酸性条件下被水解，而纤维素在中和作用之后被酶水解。糖化之前中和酸的需求、木糖的部分损失、以及分别的戊糖和己糖流的处理均增加了该方法的成本。此外，酸性条件的使用要求在反应器和管道系统中使用合金，这潜在地增加了设备的资本成本。

[0146] 本公开描述了高度选择性的方法的开发，其中利用廉价的试剂，木质素被选择性地破碎和萃取，并且半纤维素和纤维素依然共同存在于生物质中留待酶解糖化。被萃取至有机溶剂溶液的木质素的量为 $\geq 75\%$ ，而在残余的生物质中木聚糖和葡聚糖的回收是接近完全量的。多糖的高回收率的实现，是由于碱性条件的使用减少了半纤维素的水解和糖的分解、氨或烷基胺的使用防止了多糖在碱性条件下的剥落以及有机溶剂溶液中的高乙醇含量限制了碳水化合物的水解并使得木糖低聚物不溶。此外，所使用的碱性条件不要求在设备中使用特种合金，从而降低了资本成本。实施该方法时，在反应物或产物几乎没有无机盐（例如，NaOH、 Na_2CO_3 、 CaSO_4 ），结果是在最后几乎没有与无机废料的处置相关的费用。未反应的试剂（例如，EtOH、烷基胺和 $\text{HS}^-/\text{S}^{2-}$ ）是可循环利用的，就 EtOH 和烷基胺的情况而言，相对于水具有较低的沸点和较低的蒸发热，从而降低了能量需求和运行费用。文献中描述的许多方法使用很大的溶剂对生物质比率。在本案中，碱性条件的使用和木质素通过加入亲核物质的充分破碎意味着溶剂流能够积累高浓度的木质素，降低对大的溶剂体积的需求并且同时减少痕量的溶解的碳水化合物的损失。最后，残余的碳水化合物利用酶糖化良好，这很可能是由于在预处理中对木质素片段的高水平的萃取、对半纤维素和木质素之间酯键的有效剪切、以及多糖聚合度的部分降低。有机溶剂的使用提高了生物质的可润湿性和容易地渗透进底物的孔洞的能力。采用高 pKa 的有机碱（例如，烷基胺）的碱性条件和强亲核物质（例如，烷基胺、硫化物）的存在相结合，使得本方法能够生产易于糖化的生物质，甚至那些具有高木质素含量的原料（例如，柳枝稷、蔗渣）亦可。在实施例 12 和 14 中证明了预处理的广泛性，其中范围广泛的木质纤维质材料（此处以玉米芯、柳枝稷、蔗渣、甘蔗秸秆和黄杨作为代表）表现出在预处理之后糖化良好。

实施例

[0147] 预处理生物质以获得易于糖化的富集碳水化合物的生物质

[0148] 以下所述的实验工作的目的,是开发就木质纤维素而言使生物素的萃取和糖的保留均最大化的经济的预处理方法,和生产易于糖化的富集碳水化合物的生物质,所述生物质在酶解糖化时将产生最高的单体糖收率。所采用的方法是选择性地破碎木质素和将其萃取至适合的溶剂中,同时在固体残余物中保留糖。结果发现,有机溶剂和烷基胺以及任选的某些亲核物质如 NH_3 、硫醇、多硫化物和硫化物的共同存在,选择性地使生物质的木质素组分破碎和溶解,留下易于糖化的富集碳水化合物的生物质。

[0149] 预处理之前,在 Wiley 刀式粉碎机中用 1mm 的筛网将柳枝稷、玉米芯、甘蔗秸秆、黄杨和蔗渣磨碎。

[0150] 下列缩写被用于实施例中:“HPLC”为高效液相色谱;“C”为摄氏温度或摄氏度;“%”为百分比;“wt”为重量;“w/w”为重量对重量;“mL”为毫升;“OD”为外直径;“ID”为内直径;“h”为小时;“rpm”为转每分;“EtOH”为乙醇;“mg/g”为毫克每克;“g/100mL”为克每 100 毫升;“N”为正常;“g”为克;“NaOH”为氢氧化钠;“w/v”为重量每体积;“v/v”为体积对体积;“ NH_3 ”为氨;“mm”为毫米;“mL/min”为毫升每分钟;“min”为分钟;“mM”为毫摩尔每升。

[0151] 材料

[0152] 硫酸,氢氧化铵,乙酸,乙酰胺,酵母提取物,2-吗啉乙磺酸 (MES),磷酸钾,葡萄糖,木糖,胰蛋白胨,氯化钠和柠檬酸,一甲胺和二甲胺自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 获得。Spezyme CP 和 Multifect CX12L 来自 Genecor (Genecor International, Palo Alto, CA) 而 Novozyme 188 来自 Novozyme (Novozymes, 2880 Bagsvaerd, Denmark)。

[0153] 实施例 1

[0154] 有效的乙醇浓度

[0155] 本实施例的目的,是检测在不存在 pH 控制的情况下,水中的溶剂(即乙醇)的浓度对碳水化合物的回收和木质素的溶解/萃取的影响。蔗渣(0.2g, 95.78%干物质)被悬浮于包括多种 EtOH 浓度(从 0 至 80%)的 1.56mL EtOH/水溶液中。悬浮液被加入至用 Swagekock 装置 (Penn Fluid System Technologies, Huntingdon Valley, PA) 封端的 316 型不锈钢管(1/4 英寸 ID, 3/8 英寸 OD, 4 英寸长)中。这些被置于流化的沙浴 (Techne Model SBS-4, Techne Inc., Burlington, NJ) 中并于 180°C 加热 2h, 然后通过室温下浸入水浴中迅速冷却。将样品从上述管内移出,并通过在桌面离心机 (Spectrifuge 16M, Labnet International Inc., Edison, NJ) 中,于室温使用 Spin-X 过滤器 (Costar, Corning Inc., Corning NY) 在 14,000rpm 离心进行过滤,以除去溶解的木质素。用 0.5mL 与 180°C 处理中所使用的浓度相同(0-80% EtOH, 溶于 H_2O) 的 EtOH/ H_2O 洗涤 (4x) 每一样品的残留物。然后,所述样品被允许在室温风干(至 ~92%干物质),并采用美国国家可再生能源实验室 (NREL) 的方法 (Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass-Version 2006, Amie Sluiter 等人,可从 NREL 网站获得) 测定了残余物的葡聚糖、木聚糖和酸不溶的木质素含量。

[0156] 随后的酶解糖化

[0157] 以上制备的风干的样品以~14%的固相含量被悬浮于50mM pH 4.6的柠檬酸盐缓冲液中。糖化酶,例如Spezyme CP、Multifect CX12L和Novozyme 188被分别以6:3:6mg/g纤维素的浓度加入。还加入了1%(w/v)的Tween 20和0.01%(w/v)的NaN₃,后者用于防止微生物生长。样品(~0.4mL)被置于包含两个5mm玻璃珠的旋盖小瓶中,并于46°C在以250rpm运行的摇床上孵育。等分试样在4h时以及从开始时起每24h的间隔被移出用于分析,并用0.01N H₂SO₄稀释41.25倍。然后通过Spin-X过滤器过滤样品,并通过HPLC(Agilent series 1100/1200, Agilent Technologies, Wilmington, DE)分析滤液。BioRad HPX-87H Aminex柱(Bio-Rad Laboratories, Hercules CA 94547)被用于分馏所释放的糖,分馏采用0.01N H₂SO₄作为流动相,流速为0.6mL/min。上述柱被维持在60°C。示差折光率检测器被用于检测洗脱的糖,并被维持在55°C。葡萄糖、木糖和阿拉伯糖的保留时间分别为9.05、9.72和10.63分钟。表1A概括了在0%-80%的EtOH进行预处理之后,葡聚糖和木聚糖回收的百分比和酸不溶的(AI)木质素含量的百分比变化。

[0158] 表 1A

[0159] 按照实施例 1 进行预处理之后的葡聚糖和木聚糖回收

[0160]

预处理 (% EtOH, 溶于水)	%残余物中的葡聚糖 回收	%残余物中的木聚糖 回收	AI 木质素含量 变化%
0	83.0%	29.0%	+27.6%
20	88.7%	30.8%	+15.2%
40	86.0%	57.6%	-10%
60	91.9%	87.4%	-25.6%
80	88.6%	91.1%	-28.8%

[0161] 表1A中显示的结果表明,木质素的萃取随着EtOH含量的提高而提高,推测是因为木质素的溶解度随着EtOH浓度的提高而提高。然而,即使在高的乙醇浓度下,被萃取的木质素的量也是不太多的。

[0162] 随着EtOH的提高,半纤维素的水解和木糖低聚物的溶解度下降,提高了残余物中木聚糖和木糖低聚物的回收。随着EtOH含量的提高,通过预处理释放的乙酸盐的量也降低,与EtOH浓度提高时生物质自动水解的降低相一致。

[0163] 表1B显示在不同的EtOH浓度下预处理之后,经过96h的酶解糖化之后的葡萄糖和木糖收率。当预处理中的EtOH浓度从0提高至20%时,纤维素的糖化提高,不过伴随着更高的预处理EtOH浓度,纤维素的糖化转而降低。在高于20%的EtOH浓度,观察到了木质素和纤维素的部分水解的可能的降低(纤维素聚合度的提高降低了随后的糖化的葡萄糖收率-表1B)。

[0164] 表 1B

[0165] 如实施例 1 中所述进行了预处理,并酶解糖化 96 小时之后的单体葡萄糖和木糖收率

[0166]

% EtOH, 溶于水 (v/v)	葡萄糖单体, 仅糖化 (%理论收率)	木糖单体, 仅糖化 (%理论收率)	葡萄糖单体总收率 (%理论收率)	木糖单体总收率 (%理论收率)
0	38.43	34.98	31.86	10.16
20	44.48	45.52	39.46	14.01
40	29.62	38.55	25.45	22.23
60	16.81	24.64	15.45	21.52
80	6.8	7.22	6.02	7.01

[0167] 单体糖的回收 (表 1B), 尤其是木糖的回收, 在较低的 EtOH 浓度时相当差。在低 EtOH 浓度时, 由半纤维素的乙酰基的水解在高温下产生的酸性环境, 使得半纤维素水解。在预处理之后的过滤和洗涤中, 溶解的木糖和一些葡萄糖被损失。在较高的 EtOH 浓度, 纤维素、半纤维素和木质素的部分水解更少, 使得糖化收率降低。在低和高乙醇浓度的上述表现共同导致低的单体葡萄糖和木糖总收率。

[0168] 实施例 2

[0169] 碱性有机溶剂溶液预处理对木质素萃取的影响

[0170] 本实施例的目的是在不同的 EtOH/H₂O 比率, 测量提高有机溶剂溶液预处理的 pH 对碳水化合物的保留和木质素的萃取以及在随后的酶解糖化过程中的单体糖的影响。考虑到自动水解使 pH 降低、使木聚糖水解、并促进木糖的损失, 通过添加 NaOH 提高了预处理的 pH。较高的 pH 对木糖回收的影响如下所示。蔗渣 (0.25g, 95.78% 干物质) 被悬浮于 1.75mL 包含 EtOH (20-80%, 溶于水) 和 8% NaOH (w/w 生物质) 加上 1mg 蒽醌 (AQ, 用于木质素破碎的催化剂) 的溶剂中。该溶液初始的 pH 为 ~ 13.7。如实施例 1 中所述, 悬浮液被上载至 316 型不锈钢管中, 封端, 在 168°C 处理 140 分钟并在室温的水中冷却。从所述压力容器移出样品, 过滤、洗涤、风干并进行分析, 全部如上文的实施例 1 中所述。预处理之后, 葡聚糖、木聚糖、阿拉伯聚糖含量和木质素含量的变化显示于表 2A 中。

[0171] 随后的酶解糖化除在 1% Tween 20 (w/v) 的存在下 Spezyme : Multifect : Novozymes 188 的比率为 12 : 6 : 1.2mg/g 干固体之外, 按照实施例 1 中所述进行。表 2B 显示对事先在不同 EtOH 浓度预处理过的生物质进行 96 小时的酶解糖化之后的单体糖收率。

[0172] 表 2A

[0173] 按照实施例 2 预处理之后的葡聚糖、木聚糖和阿拉伯聚糖收率

[0174]

预处理 % EtOH, 溶于水	% 残余物中的葡聚糖回收	% 残余物中的木聚糖回收	% 残余物中的阿拉伯聚糖回收	AI 木质素含量 % 变化
20	77.5%	74.6%	51.3%	-48
45	84.0%	85.1%	68.0%	-64
60	83.6%	85.5%	76.0%	-63
70	81.3%	84.2%	75.8%	-65
80	80.0%	84.2%	86.6%	-50

[0175] 表 2B

[0176] 如实施例 2 中所述进行了预处理,并酶解糖化 96 小时之后的单体葡萄糖和木糖收率

[0177]

% EtOH, 溶于 H ₂ O	葡萄糖单体, 仅糖化 (%理论收率)	木聚糖单体, 仅糖化 (%理论收率)	葡萄糖单体总收率 (%理论收率)	木糖单体总收率 (%理论收率)
20	57.72	68.56	44.7	51.2
45	58.19	73.08	48.9	62.2
60	49.51	64.56	41.4	55.2
70	24.48	39.06	19.9	32.9
80	0.63	1.33	0.5	1.1

[0178] 如表 2A 和 2B 中所示,与实施例 1 的自动水解实验相比,本实验的碱性条件充分提高了预处理中的木聚糖保留。这一效果在低 EtOH 浓度下最为显著。NaOH 防止了所述溶液变为酸性 (最终 pH 为 ~ 10.7),从而使半纤维素避免酸催化的水解。此外,显著更多的木质素被萃取,推测是对木质素通过碱催化的分馏。糖化之后总的单体糖收率显著高于实施例 1 中所观察到的。该预处理中更高的糖回收和更高的木质素萃取,提高了随后的酶解糖化的收率。由于两个对立的过程,即在较高的 EtOH 木质素的萃取提高,这倾向于提高糖的收率,和随着 EtOH 浓度进一步提高,半纤维素和木质素的部分水解的降低,木糖和葡萄糖的糖化收率在 ~ 45% 的 EtOH 时达到顶峰。很可能由于醌的甲基化物 (其能够使糖重新聚合或与糖反应) 的形成,以及多糖的“剥落”和碱解共同造成了总的糖收率的限制。

[0179] 实施例 3

[0180] 烷基胺对糖化之前的生物质预处理的影响

[0181] 本实施例的目的,是研究在烷基胺在有机溶剂溶液 (70% EtOH, 溶于水 v/v) 中的存在,对预处理之后的生物质的木质素含量和对预处理和糖化之后的碳水化合物回收的影响。

[0182] 蔗渣 (0.375g, 95.78% 干物质) 被悬浮于 1.125mL 包含溶于 H₂O 的 70% EtOH (v/v) 的溶剂中。此外,所述溶剂还包含不同量 (6、10 或 14%) 的二甲胺 (DMA, w/w 生物质)。这些溶剂的初始 pH 分别为 12.50、12.68 和 12.80。pH 用 NaOH 调节。悬浮液被上载至 316 型不锈钢压力容器 (3/16 英寸 ID, 1/4 英寸 OD, 4 英寸长), 封端, 并且除固相含量更高和样品于 168°C 被加热 140 分钟之外,如实施例 1 中所述进行了处理。预处理的结果总结于表 3A 中。

[0183] 表 3A

[0184] 蔗渣 L/S = 3.1 (v/w) 预处理之后的葡聚糖、木聚糖和阿拉伯聚糖收率

[0185]

样品 70% EtOH (w/v)加上 (w/w 生物质)	%固体中的葡 聚糖回收	%固体中的木 聚糖回收	%固体中的阿 拉伯聚糖回收	AI 木质素% 含量变化	初始 pH
6% DMA	95.6%	103.5%	86.0%	-43%	12.50
10% DMA	98.5%	106.4%	90.0%	-48%	12.68
14% DMA	92.3%	97.1%	95%	-53%	12.80

[0186] 如表 3A 中所示,木质素的萃取随着 DMA 浓度的提高而提高,与在较高胺浓度下木质素破碎的增强相一致。与实施例 2 形成对比的是,在 70% EtOH 中用 DMA 预处理之后的碳水化合物回收相当地高。很可能通过 DMA 的使用,由于在碱性 pH 下的“剥落”反应而导致的碳水化合物损失被避免或限制,这要么是因为 pH 不像含有 8% NaOH 时那么高,要么是因为 DMA 或其向 MMA 和 NH₃ 的一些分解通过多糖的还原末端形成亚胺而阻碍了“剥落”反应。

[0187] 酶解糖化除在 1% Tween 20 (w/v) 的存在下 Spezyme : Multifect : Novozymes 188 的比率为 6.68 : 3.34 : 1.67mg/g 干固体之外,按照实施例 1 中所述进行。固相含量为 14wt%。单体的糖化收率显示于表 3B 中。

[0188] 表 3B

[0189] 酶解糖化 96 小时之后的单体葡萄糖和木糖收率

[0190]

样品 70% EtOH (w/v)加上 (w/w 生物质)	葡萄糖单体, 仅糖化 (%理论收率)	木糖单体, 仅糖化 (%理论收率)	葡萄糖单体总体 (%理论收率)	木糖单体总体 (%理论收率)
6% DMA	70.44	63.45	67.34	65.67
10% DMA	73.04	67.44	71.94	71.75
14% DMA	73.28	72	67.64	69.91

[0191] 表 3B 显示用 DMA 预处理之后的酶解糖化的单体糖收率令人吃惊地远高于在 70% EtOH 中用 8% NaOH 预处理之后的那些。此外,单体糖收率伴随着预处理溶剂中 DMA 的浓度提高。

[0192] 实施例 4

[0193] 二甲胺导致在酶解糖化时最高的收率

[0194] 本实施例的目的,是根据预处理溶液的含量比较预处理和酶解糖化之后的碳水化合物收率,将使用 DMA 和单独使用 NH₃ 或使用 NH₃ 加上 NaOH 进行比较。在进行的实验中,除蔗渣 (0.375g) 所悬浮于其中的 70% EtOH/H₂O (v/v) 溶剂 (1.125mL) 包含 8% NH₃、包含 6% NH₃ 加上 2% NaOH 或包含 14% DMA (均为 w/w 生物质) 并且实验在 168°C 进行 140 分钟外,预处理如实施例 3 中所述。葡聚糖、木聚糖和阿拉伯聚糖的预处理回收以及木质素的萃取列于表 4A 中。

[0195] 酶解糖化如实施例 3 中所述进行。在不存在 Tween 20 的情况下,在 70% EtOH 加上不同的添加剂 (w/w 生物质) 中预处理之后 96 小时时的糖化收率显示于表 4B 中。

[0196] 表 4A

[0197] 预处理之后葡聚糖、木聚糖、和阿拉伯聚糖的收率

[0198]

样品 70% EtOH 溶于 H ₂ O (w/v)加上添加剂 (w/w 生物质)	%固体中的葡 聚糖回收	%固体中的木 聚糖回收	%固体中的阿 拉伯聚糖回收	AI 木质素含量 %变化	初始 pH
14% DMA	92.3%	97.1%	95%	-53%	12.80
6% NH ₃ + 2% NaOH	97.8	107	92.4	-47%	14.0
8% NH ₃	92.0%	100%	84.0%	-20%	12.12

[0199] 表 4B

[0200] 酶解糖化 96 小时之后的单体葡萄糖和木糖收率

[0201]

样品 70% EtOH 溶于 H ₂ O (w/v)加上添加 剂 (w/w 生物质)	葡萄糖单体, 仅糖化 (%理论收率)	木糖单体, 仅 糖化 (%理论收率)	葡萄糖单体总体 (%理论收率)	木糖单体总体 (%理论收率)
14% DMA	63.54	63.43	58.65	61.59
6%NH ₃ + 2% NaOH	52.38	45.7	51.23	48.89
8% NH ₃	39.66	36.94	36.49	36.94

[0202] 在所采用的三种条件中,DMA 预处理导致了木质素最高程度的破碎和萃取,产生了酶对纤维素和半纤维素最大的可接近性,并且导致了最高的单体糖收率。

[0203] 实施例 5

[0204] 甲胺和二甲胺用于对生物质的预处理的比较

[0205] 在本实施例中,除蔗渣被悬浮于包含甲胺 (MA) 或二甲胺 (DMA) 的溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 之外,预处理的进行如实施例 3 中所述。对于包含 6、10 和 14% DMA (w/w 生物质) 的那些样品,预处理在 168°C 进行 140 分钟,而对于包含 6、10 和 14% MA 以及 14% DMA (w/w 生物质) 的那些样品,预处理在 187°C 进行 1 小时,如表 5A 中所示。尽管上述两组实验 (MA 和 DMA) 以两个不同的温度和时间进行,对于上述每种烷基胺 (就 168°C 预处理 140 分钟和 187°C 预处理 1 小时之间而言) 温度和时间对预处理回收和糖化收率只有很小的影响,并且在测量的背景误差之内 (参见 14% DMA 在 168°C 和 187°C 的情况)。看起来在上述两种烷基胺之间预处理收率并没有很大的差异。

[0206] 表 5A

[0207] 按照实施例 5 进行预处理之后的葡聚糖和木聚糖的回收

[0208]

样品 70% EtOH 溶于 H ₂ O (w/v) 加上 (w/w 生物质)	固体中的葡聚糖% 回收	固体中的木聚 糖%回收	AI 木质素含 量%变化	初始 pH
6% MA, 187°C	94.6	101.3	-42%	12.89
10% MA, 187°C	91.2	94.1	-56%	13.03
14% MA, 187°C	96.8	102.3	-60%	13.08
6% DMA, 168°C	95.6	103.5	-43%	12.59
10% DMA, 168°C	98.5	106.4	-48%	12.71
14% DMA, 168°C	92.3	97.1	-53%	12.80
14% DMA, 187°C	94.0	95.8	-53%	12.80

[0209] 除了在 1% Tween 20(w/v) 的存在下以 14% (w/w) 的固相含量, Spezyme : Multifect : Novozymes 188 比率为 6.68 : 3.34 : 1.67mg/g 干物质之外, 糖化如实施例 1 中所述进行了 96 小时。

[0210] 如表 5B 中所示, MA 预处理的生物质导致了比用 DMA 预处理的那些样品所导致的更高的葡萄糖糖化收率。就亲核物质浓度而言, 10% MA (MW = 31) 的样品应该等效于使用 14% DMA (MW = 45) 的样品, 但其葡萄糖收率却更高。就相同浓度而言, 使用 DMA 与使用 MA 相比, 木糖单体收率不是相等就是略高。在木质素的破碎中, 使用 MMA 较 DMA 可能存在空间优势, 导致略高的萃取程度和更高的糖化收率。

[0211] 表 5B

[0212] 如实施例 5 中所述进行了预处理, 并酶解糖化 96 小时之后的单体葡萄糖和木糖收率

样品 70% EtOH/H ₂ O (w/v) 加上 (w/w 生物质)	葡萄糖单体 仅糖化 (%理论收率)	木糖单体 糖化 (%理论收率)
6% MA, 187°C	75.82	61.02
10% MA, 187°C	78.05	71.48
14% MA, 187°C	80.42	70.87
6% DMA, 168°C	70.44	63.85
10% DMA, 168°C	73.04	67.04
14% DMA, 168°C	73.35	72.9
14% DMA, 187°C	71.82	68.59

[0213] 实施例 6

[0214] 巯基乙酸盐作为溶剂溶液的附加组分的效果

[0215] 本实施例的目的, 是研究有机金属-硫醇 (例如, 巯基乙酸盐) 在溶剂溶液中的效果。此外, 表面活性剂如 Tween 20 常常提高单体糖释放的速率和收率, 但会增加成本。很可能表面活性剂包被了任何残余的木质素, 降低了酶对木质素的无效的结合。通过避免了在糖化步骤中对表面活性剂的需求的改进的预处理, 能够实现成本的节约。通过在预处理中进一步增强对木质素的萃取, 或者通过对残余的木质素进行化学修饰, 使得糖化过程中更少的酶因木质素的吸附而损失, 能够实现这样的改进。

[0217] 在本实施例中,除蔗渣悬浮于其中的溶于 H_2O (v/v)的70% EtOH溶剂分别包含14% MA、14% MA和2%巯基乙酸、14% MA和2%乙醇酸或14% MA和2%甘氨酸(均为w/w生物质)之外,预处理的进行如实施例3中所述。此外,预处理是在187°C进行1小时而不是在168°C进行140分钟。

[0218] 除了反应在1% Tween 20(w/v)的存在和不存在下进行之外,随后的酶解糖化的进行如实施例5中所述。图1A显示了在70% EtOH/ H_2O 和加有或没有2%巯基乙酸盐的14% MA中于187°C预处理1小时之后,在Tween的存在和不存在下酶解糖化时的单体葡萄糖的释放。图1B显示了类似的在巯基乙酸盐的存在和不存在下的预处理之后,在Tween的存在和不存在下酶解糖化时的单体木糖的释放。在预处理中,2%巯基乙酸(w/w生物质)向70% EtOH/ H_2O (v/v)加上14% MA(w/w生物质)中的添加,显著地促进了在不存在Tween 20时的酶解糖化速率和单体糖收率。在1% Tween 20的存在和不存在下,以及在预处理中含有或不含2%巯基乙酸时的糖化动力学的比较(图1A和1B)显示,巯基乙酸对糖化速率和收率的促进达到了使Tween 20对二者的影响均更低的程度。

[0219] 为了了解巯基乙酸的化学性质,使用乙醇酸和甘氨酸(其中,巯基乙酸的-SH被分别替换为-OH和-NH)进行了类似的实验。

[0220] 图2A显示在甲胺的存在下,在如上文所述的预处理(实施例5)中,巯基乙酸对木质素的萃取的提高(更大的UV吸收)。与此相反,用70% EtOH/ H_2O (v/v)单独加上14% MA(w/w生物质)处理的生物质,与用70% EtOH/ H_2O (v/v)加上14% MA再加上2%乙醇酸或2%甘氨酸(w/w生物质)处理的生物质相比,UV光谱的振幅只有很小的差异(图2B)。

[0221] 如表6中所示,用包含巯基乙酸、或乙醇酸、或甘氨酸的70% EtOH/ H_2O (v/v)加上14% MA(w/w生物质)预处理之后,在不存在Tween 20的情况下酶解糖化96小时之后的比较表明,巯基乙酸导致了比乙醇酸或甘氨酸所导致的均显著更高的糖化速率和收率。结论是-SH基是巯基乙酸反应性的原因。巯基乙酸很可能通过还原醌的甲基化物,或通过与醌的甲基化物进行加成反应,或通过取代木质素的 α -和/或 β -芳基醚组分,与木质素在碱性条件下的破碎中生成的醌的甲基化物中间体发生反应。这些反应很可能促进木质素的进一步破碎和萃取(图2)。乙醇酸和甘氨酸反应性低得多或者是不起反应的。

[0222] 表6

[0223] 根据实施例6,预处理之后的葡聚糖和木聚糖收率,以及含有和不含Tween20的酶解糖化之后的单体葡萄糖和木糖收率

[0224]

样品 70% EtOH/H ₂ O (w/v) 加上 (w/w 生物质)	%固体中 的葡聚 糖回收	%固体中 的木聚 糖回收	葡萄糖 单体 仅糖化 (%理论 收率) 不含 Tween	木糖 单体 仅糖化 (%理论 收率) 不含 Tween	葡萄糖 单体 仅糖化 (%理论 收率) 含有 Tween	木糖 单体 仅糖化 (%理论 收率) 含有 Tween
14% MA	96.2	104.4	69.07	58.26	75.96	67.50
14% MA + 2% 巯基乙酸	92.3%	104.0%	77.37	65.78	81.89	71.38
14% MA + 2% 乙醇酸	89.4%	99.4%	72.3	57.5	82.43	69.70
14% MA + 2% 甘氨酸	97.0%	103.7%	73.06	59.85	77.63	68.27

[0225] 酶解糖化过程中低聚的和单体的糖的 HPLC 谱图的比较表明, 巯基乙酸在预处理中(糖化中不使用 Tween) 的添加导致了与添加 Tween 20(在预处理中不使用巯基乙酸) 之后所观察到的非常相似的谱图 - 即, 木乙糖的降低伴随着单体木糖的升高, 以及纤维二糖的升高伴随着单体葡萄糖的升高。就这两种条件而言, 单体糖的收率是非常接近的(图 1 和表 6)。这些观察结果与通过在预处理过程中添加巯基乙酸所导致的提高的木质素萃取是一致的(参见表 6)。还有可能通过巯基乙酸, 木质素发生衍生化, 使得残余的木质素具有更高的亲水性(羧化物的负电荷的加入), 从而导致纤维素和木聚糖酶因无效结合造成的损失降低。木质素对糖化的这种降低的影响与被认为当 Tween 20 被添加至在巯基乙酸盐不存在下预处理过的生物质中时所发生的(即, Tween 与木质素结合, 使其具有更高的亲水性) 是相似的。概括地说, 在用 70% EtOH 和烷基胺进行的预处理中, 2% 巯基乙酸盐(w/w 生物质) 的加入提高了木质素的萃取并促进了葡萄糖和木糖的糖化收率。

[0226] 实施例 7

[0227] 通过在预处理过程中向甲胺和乙胺中加入巯基乙酸盐对木质素萃取的提高

[0228] 除蔗渣悬浮于其中的溶于 H₂O(v/v) 的 70% EtOH 溶剂分别包含 14% MA、14% MA 和 2% 巯基乙酸、14% 乙胺、或 14% 乙胺和 2% 巯基乙酸(均为 w/w 生物质) 之外, 预处理的进行如实施例 3 中所述。图 2A 显示了在 70% 加上 14% 烷基胺中(含有或不含 2% 巯基乙酸盐), 于 187°C 预处理 1 小时之后的滤液的 UV 吸收光谱。在两种情况中, 向预处理溶剂中添加巯基乙酸时 UV 吸收的提高, 表明巯基乙酸增强了木质素的破碎和萃取, 与经过预处理、过滤和用溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 洗涤之后的残余物中存在的木质素的降低相一致。

[0229] 实施例 8

[0230] 木质素萃取过程中用硫化铵对生物质的预处理

[0231] 本实施例的目的, 是研究硫化铵对生物质预处理的影响。除蔗渣悬浮于其中的溶于 H₂O(v/v) 的 70% EtOH 溶剂包含 14% MA(w/w 生物质) 加上 2% 或 6% (NH₄)₂S(w/w 生物质) 之外, 预处理的进行如实施例 3 中所述。酶解糖化的进行如实施例 5 中所述。在存在或不存在 2% 和 6% 硫化铵(w/w 生物质) 的 70% EtOH 加上 14% MA 中预处理之后 96 小时, 在 1% Tween 20(v/v) 的存在和不存在下的糖化收率显示于表 7 中。

[0232] 表 7

[0233] 按照实施例 8 进行预处理之后的葡聚糖和木聚糖的收率

[0234]

样品	固体中的葡聚糖回收%	固体中的木聚糖回收%	葡萄糖单体仅糖化 (%理论收率) 无 Tween	木糖单体仅糖化 (%理论收率) 无 Tween	葡萄糖单体仅糖化 (%理论收率) 含有 Tween	木糖单体仅糖化 (%理论收率) 含有 Tween
14% MA	90.60	97.52	69.07	58.26	75.96	67.5
14% MA + 2% (NH ₄) ₂ S	91.62	98.03	78.9	68.68	84.79	76.39
14% MA+ 6% (NH ₄) ₂ S	87.02	92.43	84.2	73	90.87	83.23

[0235] 用包含 0%、或 2%、或 6% (NH₄)₂S (w/w 生物质) 的溶于 H₂O (v/v) 的 70% EtOH 加上 14% MA (w/w 生物质) 预处理之后, 在不存在 Tween 20 的情况下的酶解糖化的比较显示, 当 (NH₄)₂S 存在于预处理中时促进了随后的酶解糖化。糖化的增强很可能与木质素的破碎和萃取的提高有关 (图 3)。表 7 显示, 就木聚糖向木糖和葡聚糖向葡萄糖的糖化而言, 2% (NH₄)₂S 预处理的效果是相当显著的。对水解产物的 HPLC 分析表明, 与巯基乙酸的情况一样, 在糖化中不使用表面活性剂时, 在预处理中通过 (NH₄)₂S 对木质素的增强的萃取, 与在糖化中添加表面活性剂, 但在预处理中没有 (NH₄)₂S 时有相似的表现。表面活性剂包被残余的木质素, 而 (NH₄)₂S 则降低残余的木质素的量。6% (NH₄)₂S 在预处理中的存在导致了糖化收率的附加的提升, 大大高于利用 Tween 20 进行糖化但在没有 (NH₄)₂S 的情况下被预处理的样品的糖化收率。

[0236] 实施例 9[0237] 硫化铵增强了木质素萃取

[0238] 除蔗渣悬浮于其中的溶于 H₂O (v/v) 的 70% EtOH 溶剂分别包含 14% MA (无添加剂) 和 14% MA 加上 2% 或 6% (NH₄)₂S (w/w 生物质) 之外, 预处理的进行如实施例 3 中所述。图 3A 显示预处理之后的滤液的吸收光谱, 滤液用溶于 H₂O (v/v) 的 70% EtOH 稀释了 5000 倍。2% 和 6% (NH₄)₂S 向加入了 MA 的 70% EtOH/H₂O 中的添加显示了预处理之后的滤液的 UV 吸收的非常大的增强, 表明萃取的木质素的增加。通过在预处理中包含 (NH₄)₂S 对木质素萃取的增强与随后的酶解糖化的显著增强是一致的 (表 7)。

[0239] 实施例 10[0240] 木质素萃取过程中用元素硫对生物质的预处理

[0241] 本实施例的目的, 是研究元素硫在生物质预处理中的效果。因此, 元素硫被以等于生物质重量的 1% 或 2% 的浓度被加入所述生物质或未被加入。除含有或不含硫的生物质被悬浮于包含 14% MA (w/w 生物质) 的溶于 H₂O 的 70% EtOH v/v 中之外, 预处理的进行如实施例 3 中所述。悬浮液被置入压力容器中, 如实施例 3 中所述, 并被加热至 187°C 1 小时。将所述压力容器迅速冷却至室温之后, 过滤内容物并用溶于 H₂O 的 70% EtOH (v/v) 洗涤, 并使其风干。用溶于 H₂O 的 70% EtOH (v/v) 将用 2% 的硫预处理之后获得的滤液稀释

为 1 : 5000, 并记录其 UV 光谱。如图 3B 中所述, 与在溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 中仅有 14% MA(w/w 生物质) 相比, 在 14% MA(w/w 生物质) 加上 2% 硫(w/w 生物质) 的存在下的 UV 吸光度有显著的增强。在硫的存在下木质素的提高的萃取与预处理之后的固体中木质素的降低的含量和酶解糖化之后提高的单体糖收率是一致的(表 8)。

[0242] 对包含 1% 硫的样品, 随后的酶解糖化的进行如实施例 5 中所述, 不同之处在于: 就不含硫的样品而言, 酶解糖化在 1% Tween 20(w/v) 的存在或不存在下进行, 而就含硫的样品而言, 酶解糖化在 0.5% PEG 2000(w/w 生物质) 的存在和不存在下进行。平行实验(未显示)已表明, 1% Tween 20(w/v) 和 0.5% PEG 2000(w/w 生物质) 导致酶解糖化的几乎相同程度的增强。在存在或不存在 0.5% PEG 2000(w/w 生物质) 和 1% S(w/w 生物质) 的 70% EtOH 加上 14% MA 中预处理之后 96 小时, 在 1% Tween 20(v/v) 的存在和不存在下的预处理收率和糖化收率显示于表 8 中。

[0243] 表 8

[0244] 按照实施例 10 进行预处理之后的葡聚糖和木聚糖收率和酶解糖化之后的单体糖收率

[0245]

样品	%固体中的葡聚糖回收	%固体中的木聚糖回收	AI 木质素(%含量变化)	单体葡萄糖(%理论收率)	单体木糖(%理论收率)
70% EtOH, 14% MA	99.22	102.95	-51	71.8	59.1
70% EtOH, 14% MA + 1% Tween 20 (v/v)	99.22	102.95	-51	78.0	68.1
70% EtOH, 14% MA + 1% S	97.58	100.42	-77	86.0	82.8
70% EtOH, 14% MA + 1% S + 0.5% PEG 2000	97.58	100.42	-77	88.1	84.2

[0246] 在表面活性剂的存在和不存在下, 1% (w/w 生物质) 的元素硫向生物质中的添加均导致葡萄糖和木糖的酶解糖化收率的显著提高。硫的存在除了提高糖收率之外, 还修饰了残余的木质素, 修饰的程度使得 PEG 2000 的添加仅导致酶解糖收率的非常小的提高。

[0247] 实施例 11

[0248] 在包含甲胺和元素硫的有机溶剂溶液的预处理中添加氨的效果

[0249] 预处理的进行如实施例 3 中所述, 不同之处在于: 蔗渣包含 1% 元素硫(w/w 生物质), 并且被悬浮于添加了 14% MA(甲胺)、7% NH₃+7% MA、10% NH₃+4% MA、或 14% NH₃(均为 w/w 生物质) 的溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 中。上述样品在压力容器于 187°C 被加热 1 小时, 然后在水浴中被迅速冷却至室温。残留物被过滤、洗涤和干燥, 如上文所述。除了在 0.5% PEG 2000(w/w 生物质) 的存在和不存在下之外, 酶解糖化的进行如实施例 5 中所述。

[0250] 表 9

[0251] 实施例 11 中所述的预处理之后的单体糖收率

[0252]

样品 溶于 H ₂ O 的 70% EtOH (v/v) + 1% S (w/w 生物质) + 添加剂 (w/w 生物 质)	%固体中 的葡聚糖 回收	%固体中 的木聚糖 回收	单体葡萄 糖(%理论 收率), 没有 PEG	单体木糖 (%理论收 率) 没有 PEG	单体葡萄糖 (%理论收 率) 有 PEG	单体木糖 (%理论收 率) 有 PEG
14% MA	96.8	102.3	83.3	74.6	85.8	75.8
7%NH ₃ + 7% MA	90.80	96.98	79.5	68.2	82.9	71.1
10% NH ₃ + 4% MA	91.61	97.35	76.2	66.4	80.8	68.7
14% NH ₃	95.24	100.41	66.71	59.5	74.3	63.9

[0253] 如表 9 中所表明的,用氨代替甲胺对预处理时的葡聚糖和木聚糖回收没有影响。然而,随着用氨对甲胺的代替量越来越多,单体的葡萄糖和木糖的糖化收率均逐渐降低(表 9)。有和没有 PEG 2000 的情况下进行的糖化之间的差异最多也仅有百分之几。为了判断在预处理中用氨代替甲胺(虽然有收率的损失)或在糖化中添加 PEG 2000(虽然有添加剂的成本)时是否存在糖生产的成本的节约,需要对总体过程进行经济性分析。

[0254] 实施例 12

[0255] 利用甲胺和元素硫对玉米芯、柳枝稷和蔗渣进行的有机溶剂溶液预处理

[0256] 对三种不同的原料,测试了有机溶剂溶液加上甲胺加上元素硫的预处理,测试采用与实施例 10 的那些相似的条件,不同之处在于,生物质在全部测试中均与 1%元素硫混合(w/w 生物质),并被悬浮于包含 14%甲胺(w/w 生物质)的溶于 H₂O 的 70% EtOH 中。柳枝稷和蔗渣于 183°C 被加热 1 小时。玉米芯于 187°C 被加热 1 小时。用溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 洗涤样品并风干,如实施例 10 中所述,然后糖化如实施例 5 中所述,不同之处在于糖化在 PEG 2000(0.5 重量%生物质)的存在和不存在下进行。单体糖收率显示于表 10 中。

[0257] 表 10

[0258] 实施例 12 中所述的预处理之后的单体糖收率

[0259]

样品	葡萄糖单 体, 仅糖化 (%理论收率) 没有 PEG	葡萄糖单体, 仅糖化(%理 论收率) 有 PEG	木糖单体, 仅糖化 (%理论收率) 没有 PEG	木糖单体, 仅糖化 (%理论收率) 有 PEG
玉米芯, 187°C	81.99	82.67	39.06	47.65
柳枝稷, 183°C	82.06	82.95	43.58	59.26
蔗渣, 183°C	79.84	80.5	68.51	70.92

[0260] 不同的原料（例如，玉米、柳枝稷和蔗渣）之间单体葡萄糖收率只有极小的差异，并且 PEG 2000 的添加只有很小的影响。就上述三种原料而言，低聚物加上单体木糖的总收率是相近的，但单体对低聚物的比率有明显差异，蔗渣产生了最高的单体 / 低聚物比率而玉米芯产生了最低的相应比率。随着 PEG 的添加，就玉米芯和柳枝稷而言，单体形成的程度有所提高，但就蔗渣而言，提高微乎其微。很可能是在不同原料中溶解的木糖低聚物之间的结构差异而非预处理的功效，是它们向单体的酶法转化的差异的原因。

[0261] 这些结果展示了所开发的预处理对于木质素组成明显不同的原料 - 玉米芯、柳枝稷和蔗渣分为占干物质的 ~ 14%、23% 和 ~ 25% - 的适用范围。

[0262] 实施例 13

[0263] 使用在甲胺和硫的存在下的有机溶剂溶液预处理的玉米芯，与用稀释的氨预处理的玉米芯以及与未经处理的玉米芯之间酶解糖化的比较

[0264] 使用元素硫和甲胺的有机溶剂溶液预处理

[0265] 两批 134g (8.4% 含水量) 经过锤式粉碎的玉米芯，其中一批加上 0.5% 的元素硫 (w/w 生物质) 而另一批加上 1%，分别被悬浮于 280mL EtOH、66.7mL 水、53.3mL 甲胺溶液 (47.4g) 中，并在带有机械搅拌的 1L 压力容器中被加热至 195°C 1 小时。然后用溶于 H₂O 的 70% EtOH(v/v) 洗涤每一批各 3 次。将材料风干并将两批合并。

[0266] 稀释的氨预处理：

[0267] 向被加入 5L 反应器中的 713g (5.8% 含水量) 经过锤式粉碎的玉米芯加入 138.9g NH₄OH 溶液 (29 重量% NH₃) 和 491.1g 附加的水以得到 50% 的固相含量。反应器被加热至 140°C 20 分钟。在反应器冷却时将 NH₃ 闪蒸出，然后通过真空进一步除去 NH₃。将反应器的内容物移出并用于糖化。

[0268] 未经处理的生物质：

[0269] 对于这一糖化研究，未经处理的 (8.4% 含水量) 经过锤式粉碎的玉米芯被用作对照物。

[0270] 通过使用 NREL 方法 (参见实施例 1)，测定了葡聚糖和木聚糖含量。通过 HPLC (使用上文所述的方法，不同的是柱温为 65°C 而不是 60°C) 进行了对水解的糖的分析。该材料的糖化在置于被设定为 200rpm 和 48°C 的摇床上的 1L 玻璃锥形瓶 (Chemglass, Vineland, NJ) 中进行。上述用作比较的糖化中，平均 pH 为 5.4-5.6 的 75mmol 柠檬酸钠缓冲液被用于控制 pH。此外，还加入了各 5ppm 的青霉素和维及霉素抗生素以抑制细菌生长，以及 0.5% PEG 2000 (占固体的重量%) 以降低酶对木质素的吸附。根据固体的碳水化合物含量加载固体，所述含量为 18.3 重量% 碳水化合物 ((葡聚糖 + 木聚糖) / (葡聚糖 + 木聚糖 + 加至生物质的液体的质量))。就有机溶剂溶液、稀释的氨和未经处理的材料而言，这分别对应于 20.8%、25.2% 和 25.6% 的固相含量。所使用的酶描述于实施例 1 中。Spezyme : Novozyme188 的蛋白质重量比为 4 : 1，并且就高、中和低的酶含量而言，Spezyme/Novozyme188 蛋白质的总含量为 37.5、25 和 10mg 蛋白质 /g 葡聚糖。就高、中和低的酶含量而言，Multifect 分别以 15、10 和 4mg/g 木聚糖的量加入。将所述缓冲液、附加的水、酶、表面活性剂和抗生素在 1L 烧瓶中混合在一起，然后加入首批 60% 的固体。加热并摇动烧瓶。1 小时之后，向每一烧瓶中加入第二批的 20% 的固体。最后的 20% 的固体于 3 小时后加入。反应在设定温度持续混合下进行总共 96 小时，然后将其移出。每一反应的

代表性样品被转入离心容器中,在离心机中旋转离心,然后倒出液体部分。将固体重悬于水中,再离心,并再次倒出分离的液体。如此再重复四次。使用 HPLC 就单体含量对液体进行了分析。通过在 121°C 水解 1 小时测定了低聚物含量,在 HPLC 上对该次洗涤的部分加上硫酸 (4% w/v) 进行了再分析,与单体含量之间的差异部分被认为是来源于低聚物。通过酶解糖化产生的单体和低聚物含量被记录为烧瓶中的初始固体的初始量的葡聚糖和 / 或木聚糖的收率。这些实验的结果显示于下面的表 11 中。

[0271] 表 11

[0272] 来自如实施例 13 中所述的各种预处理的糖收率

[0273]

预处理	酶含量	%葡萄糖收率 (单体)	%木糖收率 (单体)	%转化为葡萄糖低聚物的葡聚糖	%转化为木糖低聚物的木聚糖	%来自糖化的葡萄糖收率 (单体+低聚物)	%来自糖化的木糖收率 (单体+低聚物)	%来自糖化的葡萄糖+木糖收率 (单体+低聚物)
EtOH/MA/S ₈	高	80%	62%	13%	39%	95%	102%	98%
稀释的 NH ₃	高	60%	42%	9%	38%	71%	80%	75%
未处理的	高	24%	17%	3%	4%	25%	20%	23%
EtOH/MA/S ₈	中	72%	55%	10%	42%	84%	97%	90%
稀释的 NH ₃	中	51%	36%	8%	38%	60%	74%	66%
未处理的	中	24%	17%	3%	4%	26%	20%	23%
EtOH/MA/S ₈	低	45%	39%	5%	54%	52%	94%	70%
稀释的 NH ₃	低	35%	25%	7%	42%	43%	68%	54%
未处理的	低	19%	14%	2%	2%	21%	16%	19%

[0274] 这一比较研究展示,对于糖化器中的固体含量(就有机溶剂溶液而言是 20.8% w/w),相对于稀释的氨方法和不进行预处理,有机溶剂溶液 / 甲胺 / 硫预处理在增强经过预处理的玉米芯的糖化方面的功效,显著高于在此前的实施例中 (14% w/w)。在高的酶含量时,有机溶剂溶液预处理之后向单体加上低聚物的酶法转化是接近完全量的。在全部的酶含量下,有机溶剂溶液预处理导致了向单体的葡萄糖和木糖以及向单体加上低聚物的葡萄糖和木糖的最高的转化。

[0275] 实施例 14

[0276] 在甲胺和元素硫的存在下,有机溶剂预处理在不同原料上的功效的比较

[0277] 为了比较使用甲胺 (MA) 和硫 (S) 的有机溶剂预处理对木质素含量不同的五种原料的效果,使用表 1 中详述的条件,在包含 10 或 14% MA 和元素硫的溶于水的 70% 乙醇 (v/v) 中处理了玉米芯 (AI 木质素为干物质的 14%)、柳枝稷 (AI 木质素为干物质的 23.4%)、蔗渣 (AI 木质素为干物质的 25%)、甘蔗秸秆 (AI 木质素为干物质的 25%) 和黄杨 (AI 木质素为干物质的 20%)。然后洗涤、干燥上述经过预处理的生物质并使其酶解糖化。在预处理之前,所有材料均首先在刀式粉碎机中用 1mm 的筛网粉碎。预处理以所标示的固相含

量在包含 MA 和 S 的溶于水的 70% EtOH(v/v) 中进行, 并且以所标示的温度和持续时间加热。样品被过滤, 然后用 70% EtOH 洗涤, 然后被允许在室温风干。预处理之后的葡聚糖和木聚糖含量以及回收百分比总结于表 12 中。然后, 对于 14% 的固相含量, 在 pH 4.7 的 50mM 柠檬酸钠中以 6.68 : 3.34 : 1.67mg/g 生物质的比率使用 SpezymeCP : Mutifect Xylanase : Novozyme 188, 而对于其他的固相含量, 在 pH 4.8-4.9 的 50mM 柠檬酸钠中以所标示的酶含量, 使上述样品在 48°C 糖化。单体糖收率的测定通过 HPLC (BioRad HPX-87H 柱, 60°C, 0.01N H₂SO₄ 流动相) 如实施例 1 中所示进行, 并且基于进入糖化器的经过预处理的生物质的糖含量。总的糖浓度 (低聚物加上单体) 通过在糖化结束时取出上清液并于 121°C 在 4% H₂SO₄ 中高压 1 小时然后通过 HPLC 分析而测定。糖化结果显示于表 13 中。

[0278] 这些结果显示, 对于涵盖广泛范围的、木质素含量明显不同的原料, 用包含甲胺和硫的有机溶剂对木质纤维质生物质的预处理, 产生了具有高度保留的并且富集的葡聚糖和木糖含量的经过处理的生物质。此外, 这样的预处理有利于随后的酶解糖化, 对于相同的原料集合导致高的可溶性糖收率。

[0279] 表 12

[0280] 预处理、洗涤和风干之后的葡聚糖和木聚糖含量和回收

[0281]

样品	葡聚糖含量 (%干物质)	木聚糖含量 (%干物质)	%预处理之 后的葡聚 糖回收	%预处理之 后的木聚 糖回收
玉米芯, 195°C, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 14% MA, 0.75% S (wt/wt 生物质), 用 70% EtOH (v/v) 洗涤和风干	53	38	97	100
柳枝稷, 固相含量 18%, 180°C, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 14% MA, 1% S (wt/wt 生物质), 用 70% EtOH (v/v) 洗涤和风干	50	36	93	95
蔗渣, 固相含量 11%, 180°C, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 14% MA, 1% S (wt/wt 生物质), 用 70% EtOH (v/v) 洗涤和风干	50	33	93	100
甘蔗秸秆, 固相含量 26%, 188°C, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 14% MA, 1% S (wt/wt 生物质), 用 70% EtOH (v/v) 洗涤和风干	44	29	87	88
黄杨, 固相含量 26%, 200°C, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 14% MA, 1% S (wt/wt 生物质), 用 70% EtOH (v/v) 洗涤和风干	67	26	100	89

[0282] 表 13

[0283] 葡聚糖和木聚糖通过酶解糖化分别向葡萄糖和木糖的转化

[0284]

样品	单体葡萄糖 (%理论收率)	单体木糖 (%理论收率)	葡萄糖单体+ 可溶低聚物 (%理论收率)	木糖单体+可 溶低聚物 (%理论收率)
玉米芯, 固相含量 26%, 190 ℃, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 10% MA, 1% S (wt/wt 生物质), 糖化 168 小时, 14% 固体, + 0.5% PEG 2000 (wt/wt 生物质)	92.5	54		
玉米芯, 固相含量 26%, 195 ℃, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 14% MA, 0.75% S (wt/wt 生物质), 糖化 96 小 时, 18.5% 碳水化合物含量, Spe+Novo 188 (37.5mg/g 葡聚 糖), Multifect 15mg/g 木聚糖	78	59	92	96
柳枝稷, 固相含量 26%, 180 ℃, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 14% MA, 1% S (wt/wt 生物质), 糖化 168 小时, 14% 固体, + 0.5% PEG 2000 (wt/wt 生物质)	92	68		
柳枝稷, 固相含量 18%, 180 ℃, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 14% MA, 1% S (wt/wt 生物质), 糖化 96 小时, 15% 碳水化合物含量, Spe+Novo 188 (37.5mg/g 葡聚 糖), Multifect 15mg/g 木聚糖	71	49	78	89
蔗渣, 固相含量 26%, 180 ℃, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 14% MA, 1% S (wt/wt 生物质), 糖化 168 小时, 14% 固体	89	85		

[0285]

蔗渣, 固相含量 11%, 180 °C, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 14% MA, 1% S (wt/wt 生物质), 糖化 96 小时, 11.5% 碳水化合物含量, Spe+Novo 188 (37.5mg/g 葡聚糖), Multifect 15mg/g 木聚糖	89	53	95	92
甘蔗秸秆, 固相含量 26%, 188 °C, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 14% MA, 1% S (wt/wt 生物质), 糖化 144 小时, 14% 固体, + 0.5% PEG 2000 (wt/wt 生物质)	95	67		
黄杨, 固相含量 26%, 200 °C, 1 小时, 70% EtOH (v/v), 14% MA, 1% S (wt/wt 生物质), 糖化 168 小时, 14% 固体, + 0.5% PEG 2000 (wt/wt 生物质)	90	60	100	91

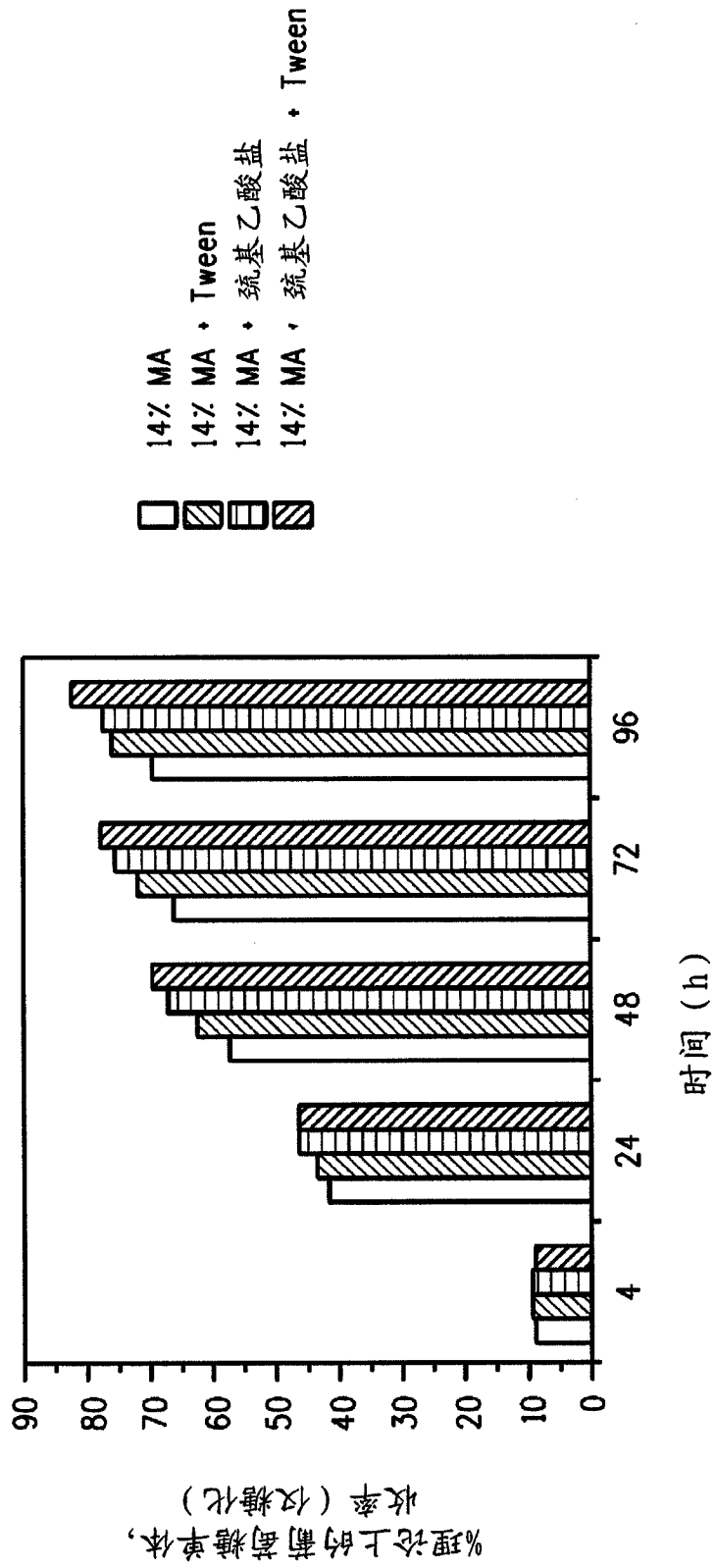


图 1A

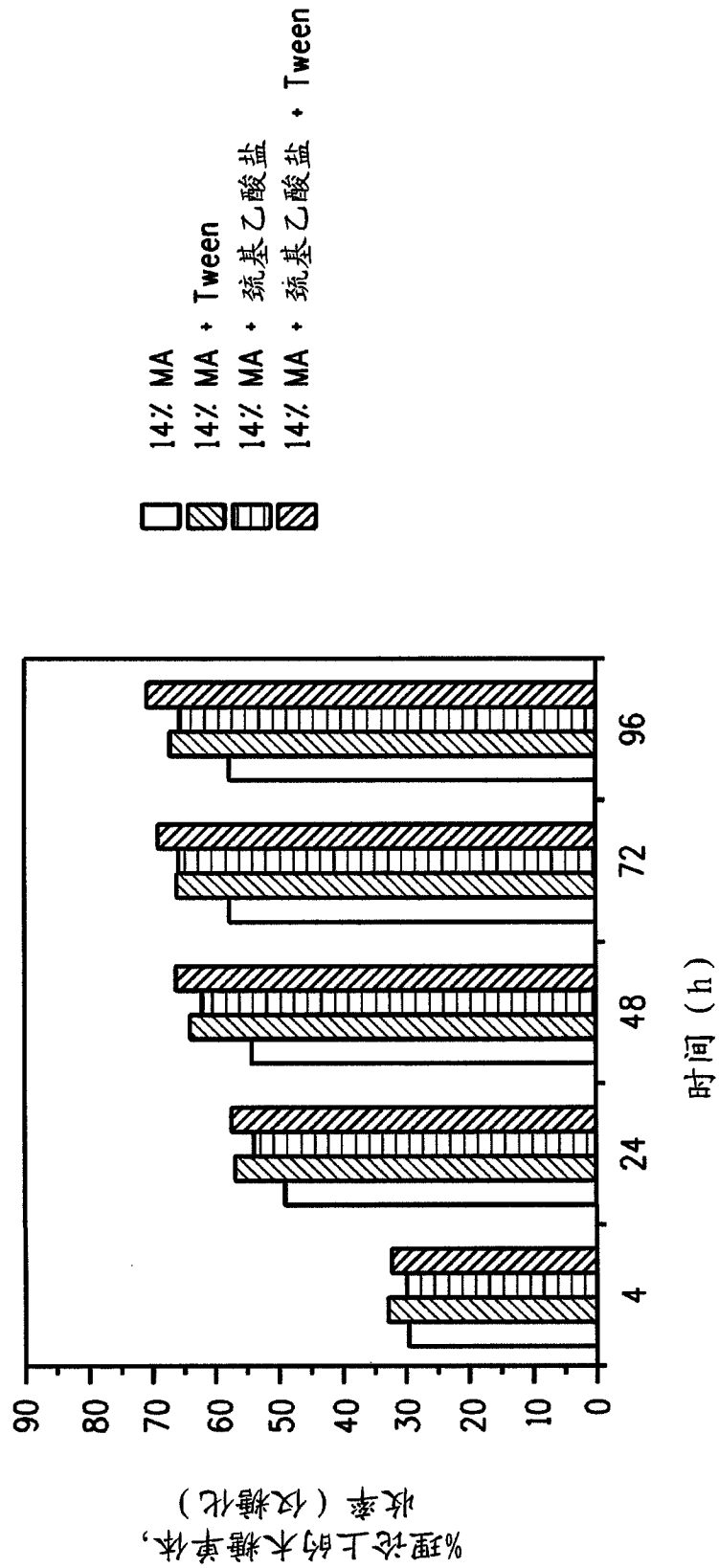


图 1B

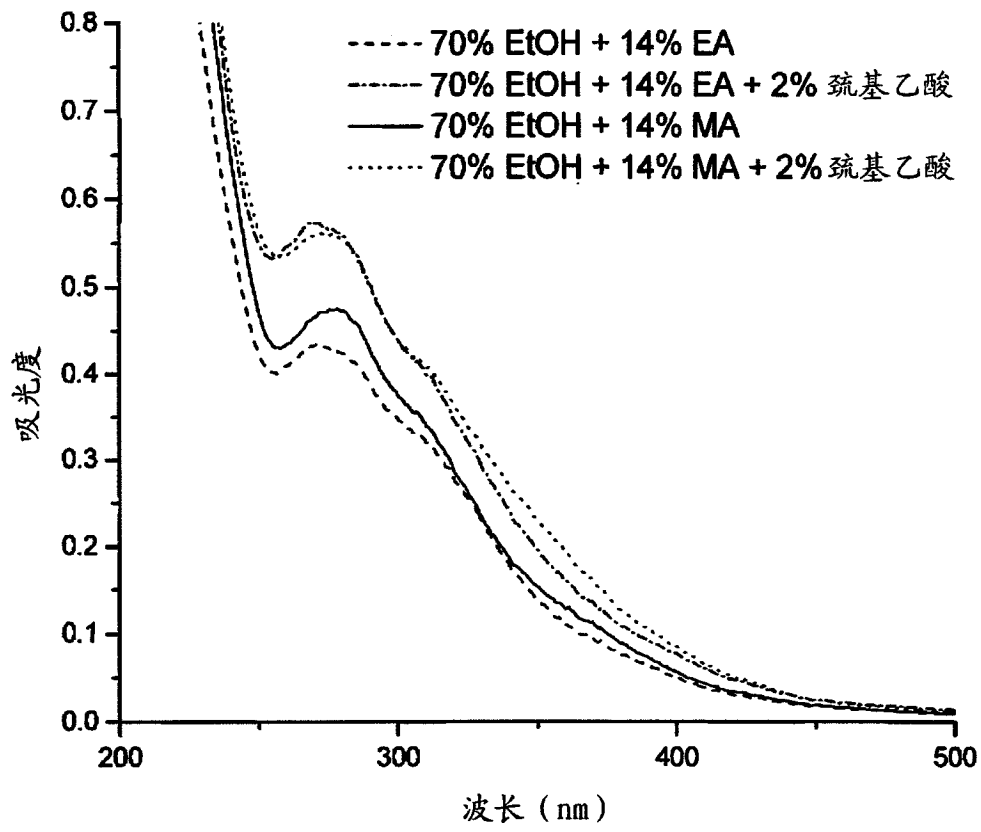


图 2A

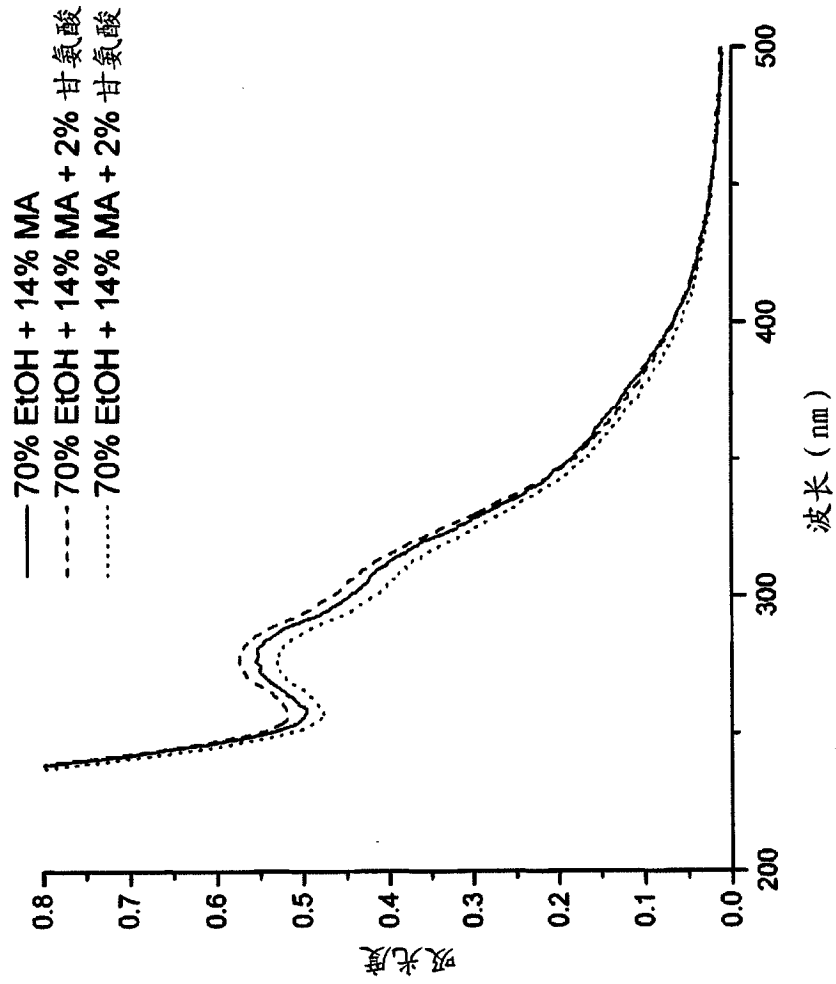


图 2B

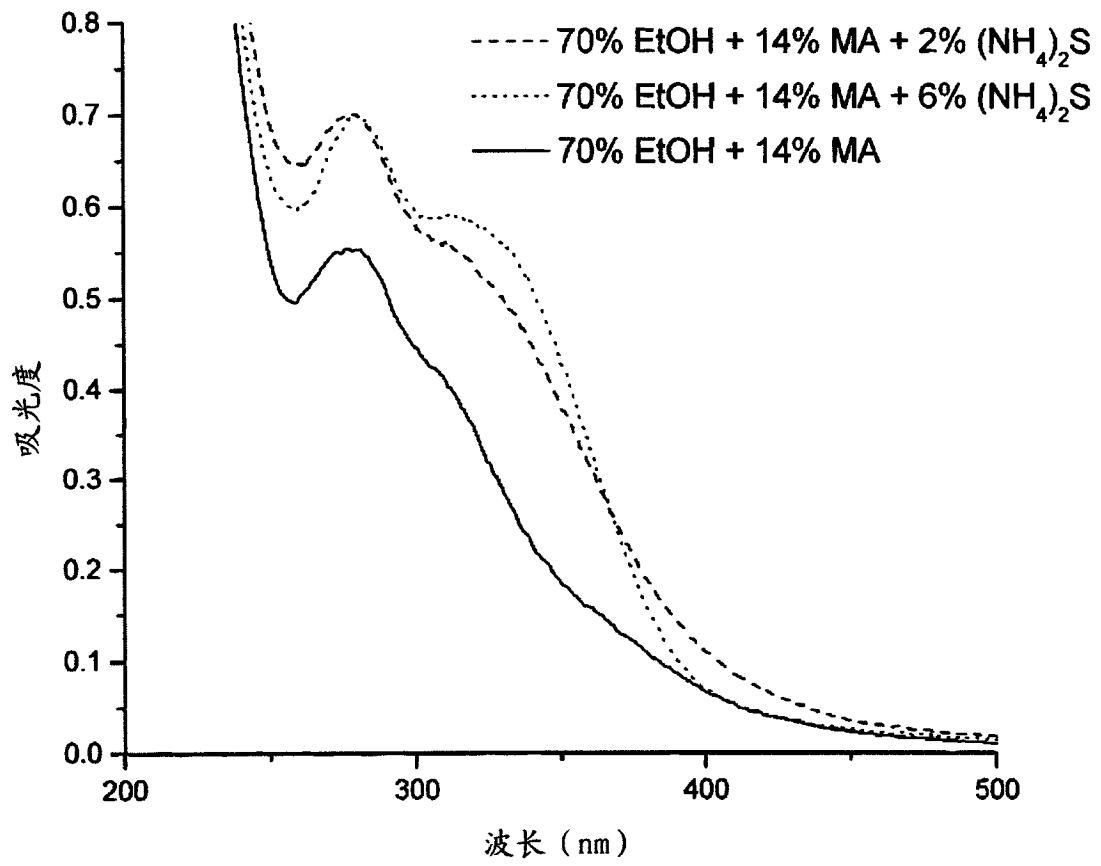


图 3A

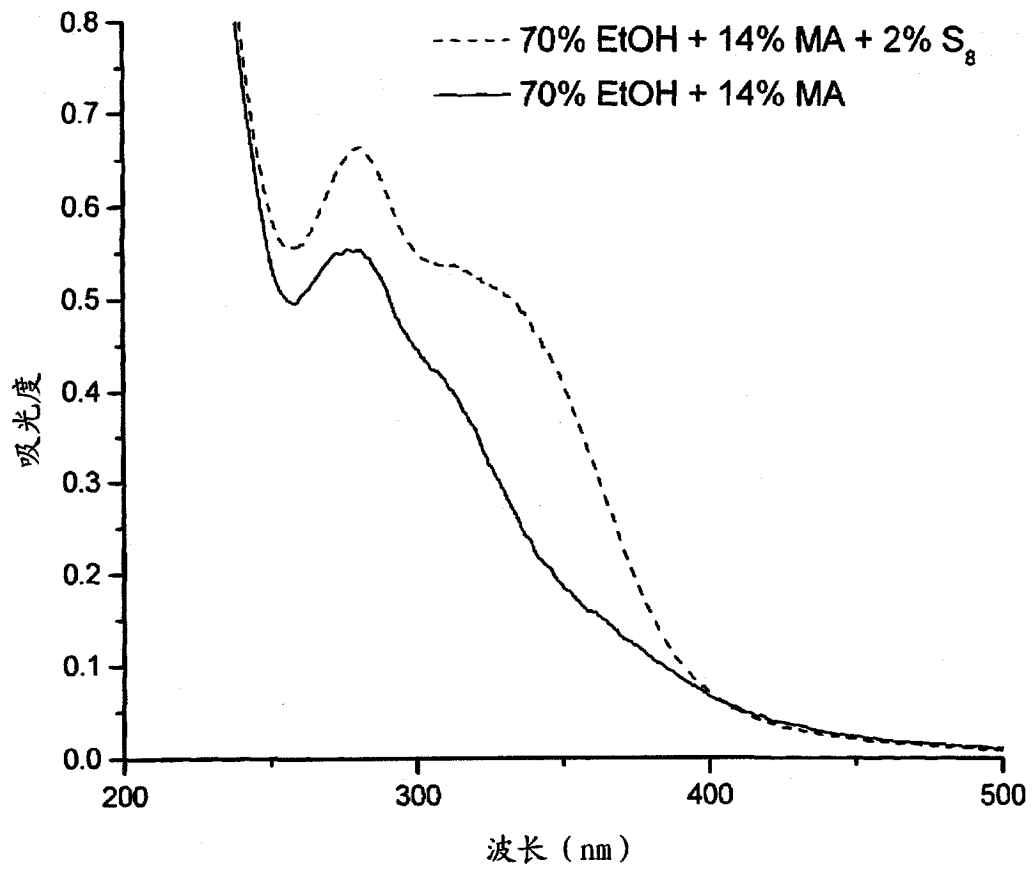


图 3B