



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104911228 B

(45)授权公告日 2019.06.14

(21)申请号 201510221387.8

C12P 7/56(2006.01)

(22)申请日 2008.08.18

C12P 7/52(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12P 7/54(2006.01)

申请公布号 CN 104911228 A

C12P 7/40(2006.01)

(43)申请公布日 2015.09.16

C12P 7/02(2006.01)

(30)优先权数据

C12P 7/20(2006.01)

11/843157 2007.08.22 US

C12P 13/14(2006.01)

(62)分案原申请数据

C12P 13/20(2006.01)

200880103584.8 2008.08.18

C12P 13/08(2006.01)

C12P 13/10(2006.01)

C12P 5/02(2006.01)

(73)专利权人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州·威尔明顿

专利权人 可持续能源联盟有限责任公司

(56)对比文件

US 2007/031918 A1,2007.02.08,

US 2007/0031953 A1,2007.02.08,

(72)发明人 S.M.亨尼西 J.弗里恩德

R.T.埃兰德 M.P.塔克三世

Asli Isci et al.Aqueous ammonia

soaking of switchgrass followed by

simultaneous saccharification and

fermentation.《Appl Biochem Biotechnol》

.2007,69-77.

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 李波 万雪松

Tae Hyun Kim et al.Pretreatment and

fractionation of corn stover by ammonia

recycle percolation process.《Bioresource

Technology》.2005,2007-2013.

(51)Int.Cl.

C12P 19/02(2006.01)

C12P 7/16(2006.01)

C12P 7/06(2006.01)

C12P 7/18(2006.01)

审查员 李影

权利要求书2页 说明书16页

(54)发明名称

改善的生物质预处理

(57)摘要

本发明涉及改善的生物质预处理。具体地,本发明提供了用于生产改善的预处理过的生物质产品的方法,所述预处理过的生物质产品用于糖化,随后通过发酵生产目标化学制品,它包括从所述预处理过的生物质产品中移除糖化和或发酵抑制剂。具体地讲,使用本发明的方法生产的预处理过的生物质产品具有更少的糖化和/或发酵抑制剂,并且无糖含量损失。

1. 用于从生物质生产糖化水解产物的方法,所述方法包括:
 - a) 提供生物质;
 - b) 通过在合适条件下使所述生物质与含氨的水溶液接触以形成生物质-氨水混合物来预处理所述生物质,其中所述氨以至少足以保持生物质-氨水混合物的碱性pH的浓度存在,但是其中所述氨的含量相对于生物质的干重为12重量%或更低,此外其中所述生物质的干重具有的固体浓度相对于生物质-氨水混合物的重量为15重量%或更高,从而形成包含一种或多种糖化或发酵抑制剂化合物的预处理过的生物质固体产物和生物质预处理液体,其中所述抑制剂化合物包括乙酸、乙酰胺或其组合;
 - c) 从所述生物质-氨水混合物移除所述生物质预处理液体以提供预处理过的生物质固体产物,所述固体产物具有减少量的乙酸或乙酰胺,并且糖含量的减少不超过相对于所述生物质-氨水混合物中的含量的10%;以及
 - d) 在不存在步骤(c)中移除的生物质预处理液体的情况下糖化步骤(b)的预处理过的生物质固体产物以形成含有可发酵糖的糖化水解产物。
2. 权利要求1的方法,所述方法还包括通过一种或多种以下途径来加入附加含水组分:
 - i) 在步骤(b)之前
 - ii) 作为步骤(b)的附加组分;或
 - iii) 在步骤(b)之后作为洗涤步骤。
3. 权利要求2的方法,其中所述附加含水组分选自蒸汽、水和缓冲液。
4. 权利要求3的方法,其中所述含水组分是蒸汽并作为步骤(b)中的附加组分被加入,其中所述蒸汽在预处理期间部分地冷凝以形成部分生物质预处理液体。
5. 权利要求1的方法,所述方法还包括发酵权利要求1的糖以生产目标化学制品。
6. 权利要求1的方法,其中所述液体移除方法选自排出、滗析、过滤、离心和挤压。
7. 权利要求1的方法,其中所述生物质-氨水混合物的pH大于8。
8. 权利要求1的方法,其中在使所述生物质与含氨的水溶液接触之前对所述生物质施加真空。
9. 权利要求1的方法,其中所述生物质的干重具有高固体浓度,所述浓度相对于所述生物质-氨水混合物的重量为至少15% 至80%。
10. 权利要求1的方法,其中使所述含有可发酵糖的糖化水解产物与选自发酵单胞菌、发酵细菌和酵母的发酵微生物接触,从而产生目标化学制品。
11. 权利要求1的方法,其中所述氨的含量相对于生物质的干重小于10重量%。
12. 权利要求11的方法,其中所述氨的含量相对于生物质的干重为6重量% 或更低。
13. 权利要求1的方法,其中所述生物质选自生物能作物、农业残余物、市政固体垃圾、工业固体垃圾、庭院垃圾、木材和林业垃圾。
14. 权利要求1的方法,其中生物质选自:柳枝稷、废纸、来自造纸业的淤渣、玉米粒、玉米芯、玉米壳、玉米秸秆、玉米纤维、草、小麦、小麦秸秆、大麦、大麦秸秆、稻秆、甘蔗渣、高粱、大豆、获自谷物的研磨物的组分、树木、枝、根、叶、木屑、锯末、灌木及矮树丛、蔬菜、水果、花和动物粪肥。
15. 权利要求14的方法,其中生物质选自玉米芯、玉米秸秆、玉米纤维、玉米壳、甘蔗渣、锯末、柳枝稷、小麦秸秆、稻秆、和草。

16. 权利要求1所述的方法,其中生物质是干草。
17. 权利要求15所述的方法,其中生物质选自玉米芯、玉米秸秆、玉米纤维、锯末、和甘蔗渣。
18. 权利要求1的方法,其中生物质来源于多种给料。
19. 权利要求1的方法,其中所述氨来自选自氨气、氢氧化铵、尿素、以及它们的组合的来源。
20. 权利要求1的方法,其中 (b) 在4℃至200℃的温度下执行。
21. 权利要求15的方法,其中 (b) 在75℃至150℃的温度下执行。
22. 权利要求16的方法,其中 (b) 在大于90℃至150℃的温度下执行。
23. 权利要求1的方法,其中执行 (b) 最多25小时的一段时间。
24. 权利要求18的方法,其中执行 (b) 最多8小时的一段时间。

改善的生物质预处理

[0001] 本申请是申请日为2008年8月18日的中国专利申请200880103584.8“改善的生物质预处理”的分案申请。

[0002] 政府权利声明

[0003] 本发明由美国政府支持并受与能源部签署的合同号04-03-CA-70224和DE-FC36-03G013146的约束。美国政府拥有本发明的必然权利。

技术领域

[0004] 提供了用于生产改善的预处理过的生物质产品的方法,所述产品用于糖化以生产高含糖量的水解产物。具体地讲,使用本发明的方法产生的预处理过的生物质具有更少的糖化和/或发酵抑制剂。

背景技术

[0005] 纤维质的和木质纤维质的给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给料,用于生产有价值的产品如燃料和其他化学制品。由碳水化合物聚合物(包括纤维素、半纤维素、葡聚糖和木质素)组成的纤维质的和木质纤维质的给料以及垃圾一般用多种化学、机械和酶方法进行处理以释放主要的己糖和戊糖,它们然后能进行发酵产生有用产物。

[0006] 首先,将生物质给料进行处理以制备糖化酶更易利用的纤维质和木质纤维质材料的碳水化合物聚合物,该过程通常称为预处理。然后将预处理过的生物质在存在糖化酶的条件下进一步水解以在水解产物中释放低聚糖和/或单糖。用于从预处理过的生物质中生产可发酵糖的糖化酶通常包括一种或多种糖苷酶,如纤维素水解糖苷酶、半纤维素水解糖苷酶、和淀粉水解糖苷酶,以及肽酶、脂肪酶、木素酶和/或阿魏酸酯酶。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. (2002) 66:506-577)。

[0007] 在预处理过的生物质期间会释放纤维素、半纤维素和木质素的不同组分,它们可能包括糖和/或副产品,包括化合物如乙酸、甲酸、乙酰丙酸、糖醛和酚类化合物。一些副产品是抑制剂,因为它们影响糖化酶的活性和/或在随后发酵中使用的微生物的生长和代谢。这些抑制剂能降低糖化和/或发酵过程的效率。已经进行了一些通过附加步骤移除所述抑制剂的尝试,例如收集糖从而制造预水解产物。然而这些措施并不令人满意,因为它们是不经济的并且导致糖产量减少。

[0008] 因此,需要生产预处理过的生物质的预处理方法,该预处理过的生物质具有最大的糖保留和最少的抑制剂,并且不形成分离的预处理糖流(预水解产物)。这将提供一种更经济有效的生物质输入用于糖化及随后的发酵以生产有用产品。

发明内容

[0009] 本发明提供了用于制备改善的预处理过的生物质产品的方法,所述方法包括:

[0010] a) 提供生物质;

[0011] b) 通过在合适条件下使所述生物质与含氨水的溶液接触以形成生物质-氨水混合物来预处理所述生物质,其中所述氨以至少足以保持生物质-氨水混合物的碱性pH的浓度存在,但是其中所述氨的含量相对于生物质的干重小于约12重量%,此外其中所述生物质的干重具有高固体浓度,所述浓度相对于生物质-氨水混合物的重量为至少约15%,从而形成包含一种或多种抑制剂化合物的预处理过的生物质固体产品和生物质预处理液体;和

[0012] c) 移除所述生物质预处理液体;

[0013] 其中所述预处理过的生物质固体产品具有减少量的抑制剂化合物但糖含量未显著减少。

[0014] 在其他方面,所述方法还包括通过一种或多种以下途径来加入附加含水组分:

[0015] i) 在步骤(b)之前

[0016] ii) 作为步骤(b)的附加组分;或

[0017] iii) 在步骤(b)之后作为洗涤步骤。

[0018] 此外,可糖化预处理过的生物质固体以形成糖水解产物,然后可将糖水解产物发酵以生产目标化学制品。

[0019] 本发明的附加方面是已经依照本发明的方法进行预处理过的生物质,以及通过糖化已经依照本发明的方法进行预处理过的生物质生产的水解产物。其他方面是通过生物催化发酵水解产物生产的目标化学制品,所述水解产物通过糖化已经依照本发明的方法进行预处理过的生物质生产。

[0020] 生物质指任何纤维质或木质纤维质材料,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、木材和林业垃圾以及它们的组合。含氨的水溶液可来源于氨气、氢氧化铵、尿素、以及它们的组合。含氨的水溶液可包含至少一种附加的碱。此外,在本发明的方法中,可在将所述生物质与含氨的水溶液接触之前对生物质施加真空。也可在步骤(c)之前移除氨;按可反向循环到预处理反应器中。在本发明的方法中氨和生物质可在介于约4℃和约200℃之间发生反应。在本发明的方法中可使用增塑剂、软化剂或它们的组合。此外,为了减小尺寸、增加暴露的表面积、和/或提高氨水或糖化酶的可及性,可在步骤(a)之前、期间、或之后施加能量到生物质上。

具体实施方式

[0021] 申请人特别将所有引用的参考文献的完整内容引入到本公开内容中。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,其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数值。

[0022] 本发明提供了用于预处理生物质的方法,所述预处理减少了预处理过的生物质产品中抑制剂的量。由于减少了抑制剂的含量,因此用于从所述生物质中生产有价值产品的糖化和发酵过程变得更有效率。高效利用包括生物质垃圾在内的可再生生物质生产有价值的化学制品可降低对油的需求。

[0023] 定义:

[0024] 在本公开中使用了许多术语。给出了如下定义。

[0025] 术语“可发酵糖”或“糖”指在发酵过程中能被微生物用作碳源的低聚糖和单糖。

[0026] 术语“木质纤维质”指包含木质素和纤维素的组合物。木质纤维质材料也可包含半纤维素。

[0027] 术语“纤维质”指包含纤维素的组合物。

[0028] 生物质的“干重”意指移除了全部的或基本上全部的水分后的生物质重量。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。

[0029] 术语“增塑剂”和“软化剂”指引起聚合物链上或聚合物链间的内聚分子间力减小的物质。此类物质可例如降低结晶度或打断在木质素和非木质素碳水化合物纤维间的键(例如纤维素或半纤维素)。

[0030] 术语“糖化”指从多糖中生产可发酵糖。

[0031] 关于生物质的术语“处理”或“预处理”与以下方法相关。用反应物处理生物质以形成经处理的生物质产品, 也可将其称作处理形成的预处理过的生物质或预处理形成的预处理过的生物质。使用“预”区分在糖化生物质之前进行的生物质处理,

[0032] 术语“预处理过的生物质”意指在糖化之前已经经过预处理过的生物质。预处理方法在下文中详述。

[0033] “生物质”指任何纤维质或木质纤维质材料, 并包括包含纤维素的材料, 以及任选地还包含半纤维素、木质素、淀粉、低聚糖和/或单糖的材料。生物质也可包括附加组分如蛋白质和/或脂质。如本发明所述, 生物质可来源于单一来源, 或者生物质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或纤维的混合物, 或草和叶的混合物。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、庭院垃圾、木材和林业垃圾。生物质的实例包括但不限于玉米粒、玉米芯、作物残余如玉米壳、玉米秸秆、玉米纤维、草、小麦、小麦秸秆、大麦、大麦秸秆、干草、稻秆、柳枝稷、废纸、蔗渣、高粱、大豆、获取自谷物的研磨物的组分、树木、枝、根、叶、木屑、锯末、灌木及矮树丛、蔬菜、水果、花和动物粪肥。在一个实施方案中, 用于本发明的生物质包括具有相对较高的碳水化合物值的生物质, 它们相对密集, 和/或相对易于收集、运输、贮存和/或处理。在本发明的一个实施方案中, 可用的生物质包括玉米芯、玉米秸秆、玉米纤维和甘蔗渣。

[0034] 对于本发明而言, “含氨的水溶液”指在含水介质中使用氨气 (NH_3)、包含铵离子的化合物 (NH_4^+) 如氢氧化铵或硫酸铵、降解时释放氨的化合物如尿素、以及它们的组合。

[0035] 用于糖化的“酶聚生体”是能作用于生物质混合物以生产可发酵糖的酶的组合。通常糖化酶聚生体可包括一种或多种糖苷酶; 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、木素酶和阿魏酸酯酶。

[0036] 在共有的和共同未决的美国专利申请 US 20070031918A1 中描述了用低浓度氨水预处理高浓度生物质。申请人已经令人惊讶地发现, 当使用 US 20070031918A1 的方法预处理生物质时, 糖化和/或发酵的抑制剂从该生物质中释放出来, 同时仅释放很少的糖。释放的糖可忽略不计。例如, 可忽略不计的糖损失为约 0.0% 至最多约 10%, 或约 0.01%,

0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.07%, 或0.09%。该抑制剂是液体部分的可溶性组分, 所述组分能从预处理过的生物质固体中分离出来。移除液体也移除了抑制剂并且基本上不降低糖收率, 因此产生改善的预处理过的生物质产品。

[0037] 低浓度氨水预处理

[0038] 在本发明方法所用的低浓度氨水预处理过程中, 氨浓度是足以保持生物质-氨水混合物碱性pH的最小浓度, 并且相对于生物质的干重计其最大值小于约12重量%。该低氨浓度对进行预处理而言足够, 并且该低浓度相对于生物质的干重也可小于约10重量%。也可使用相对于生物质的干重6%的非常低的氨浓度用于预处理。碱性意指大于7.0的pH。生物质-氨水混合物尤其适合的pH大于8。在一个实施方案中, 氨的含量相对于生物质的干重小于约10重量%。氨的含量相对于生物质的干重小于约6是尤其合适的。

[0039] 含氨的水溶液也任选地包含至少一种附加的碱, 如氢氧化钠、碳酸钠、氢氧化钾、碳酸钾、氢氧化钙、和碳酸钙。可加入所述至少一个附加的碱, 加入的量使其与铵结合形成的总碱量相对于生物质的干重小于约20重量%。优选第二碱加氨的总量为小于约15重量%。例如可利用附加碱中和生物质中的酸以提供金属离子用于糖化酶或发酵培养基。

[0040] 在本发明的方法中, 生物质的干重的初始浓度为生物质-氨水混合物重量的至少约15%。通常生物质的干重的初始浓度为生物质-氨水混合物的重量的至少约15%至约80%。在另一方面, 通常生物质的干重的初始浓度为生物质-氨水混合物的重量的至少约15%至约60%。生物质-氨水混合物中的生物质百分比一直较高以最小化对糖浓度的需要, 所述糖源自糖化预处理过的生物质用于发酵产生。高生物质浓度也减少了预处理材料的总体积, 使所述方法更加经济。

[0041] 可直接使用获取自所述来源的生物质, 或可施加能量于生物质以减小尺寸、增加暴露的表面积、和/或提高生物质中存在的纤维素、半纤维素、和/或低聚糖对氨和对用于从预处理过的生物质中生产糖的糖化酶的可用性。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纤维素、半纤维素、和/或低聚糖对氨和对用于从预处理过的生物质中生产糖的糖化酶的可用性的能量装置包括但不限于研磨、压碎、碾磨、切碎、剁碎、盘磨、超声波、和微波。本专利申请的施加能量可发生在预处理之前、期间或之后。

[0042] 用低浓度氨水溶液预处理过的生物质在任何合适的容器中进行。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 (如 General Methods; 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, 生物质和氨溶液可在容器中结合, 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。可使用的一种尤其合适的设备在共有的和共同未决的美国专利申请 CL3949 中描述, 使用 CL3949 设备进行低氨预处理的一个系统在共有的和共同未决的美国专利申请 CL3950 中描述。

[0043] 在接触所述生物质与含氨的水溶液之前, 可对包含生物质的容器施加真空。通过从生物质孔中抽出空气, 可使氨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的类型,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)。

[0044] 生物质与含氨的水溶液的接触在约4℃至约200℃的温度下执行。生物质和氨的初次接触在4℃下执行,允许在此温度下浸渍,这可提高对未经预处理的天然生物质的糖化效率。在另一个实施方案中,所述生物质的接触在约75℃至约150℃的温度下执行。在另一个实施方案中,所述生物质的接触在大于90℃至约150℃的温度下执行。

[0045] 使生物质与含氨的水溶液的接触最多约25小时的一段时间。更长的预处理时间是可能的,然而出于实用原因和经济上的原因,可优选更短的时间。通常氨接触处理时间为约8小时或更短。

[0046] 在一个实施方案中,预处理方法可在相对高的温度下执行相对短的时间,例如在约100℃至约150℃下执行约5分钟至约2小时。在另一个实施方案中,预处理方法可在更低温度下执行相对长的时间,例如在约75℃至约100℃下执行约2小时至约8小时。在另一个实施方案中,预处理方法可在室温(大约22至26℃)下执行甚至更长的时间,约24小时。也可使用介于这些组合之间的其他温度和时间的组合。

[0047] 就预处理方法而言,“合适条件”如温度、与氨接触的时间、氨浓度、一种或多种附加碱的浓度、生物质浓度、生物质类型和生物质粒度是相关的;因此可根据需要调节这些变量以获得最佳产品。

[0048] 可在预处理方法(即,步骤(a))中加入增塑剂、软化剂、或它们的组合,如多元醇(例如甘油、乙二醇)、多元醇酯(例如甘油单乙酸酯)、二醇醚(例如二甘醇)、乙酰胺、乙醇、和乙醇胺。可加入增塑剂作为氨水溶液的组分、作为单独溶液、或作为干燥组分。

[0049] 可在任何合适的容器中进行预处理或预处理反应,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。合适容器可配备如叶轮等装置以用于搅拌生物质-氨水混合物。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。可以用批量方法或连续方法进行预处理反应。

[0050] 本领域的技术人员熟知发酵期间微生物生长需要氮源;因此在预处理期间使用氨提供了氮源并减少或消除了对发酵期间使用氮源补充培养基的需要。如果预处理产物的pH超出使糖化酶保持活性的范围,或超出适于发酵微生物生长的范围,则可以用酸来降低pH。用于获得所需pH使用的酸的量可导致形成盐,其浓度对糖化酶或对微生物生长造成抑制。为了减少获得所需pH所需的酸量以及在本发明预处理方法中的NH₃原料成本,氨气可从预处理反应器中排空并再循环。通常移除至少一部分氨,这降低了pH但留下一些氮,这些氮用于为随后的发酵提供此种营养物质。

[0051] 抑制剂释放和移除

[0052] 申请人已经令人惊讶地发现,与低浓度氨水反应的生物质会释放抑制剂,同时仅释放很少的糖。该抑制剂是对糖化和/或发酵有害的化合物,因此希望减少存在于预处理过的生物质产品中的抑制剂的量。发现该抑制剂是液体部分的可溶性组分,所述液体部分在生物质和低浓度氨水反应后与固体一起存在。该包含抑制剂的液体部分形成生物质预处理液体。从固体中移除生物质预处理液体消除了释放的抑制剂,留下固体的预处理过的生物

质产品,该产品具有减少的抑制剂组合物但无显著的糖损失。

[0053] 此发现和其他类型的预处理方法(如那些在US 5705369、US 2005161038、和US 20040016525中描述的方法)形成对比,其中大量的可溶性糖在预处理期间被释放。在这些方法中,通常收集液体作为含糖的预水解产物并将其用于发酵。因此如果抑制剂也被释放到液体中,没有简单的方法在不损失糖的情况下移除那些抑制剂。将需要涉及溶解物分离的方法如色谱法,此类方法比较昂贵。

[0054] 在本发明的方法中,其中溶解了被释放的抑制剂以形成生物质预处理液体的液体是一种能够以不同方法来提供的含水组分。可在预处理方法的任何阶段加入该含水组分。含水组分可以是在加入氨之前、期间或之后加入的任何水基组分。例如,当预处理过的生物质的固体浓度为相对于生物质和氨水混合物的重量约15的重量百分比时,可在加入氨水之前将水加入生物质,或可将氨水充分稀释以达到百分之15的生物质终浓度。在任何一种情况下,在该浓度下可能有液体部分存在于生物质和氨水混合物中。当生物质的重量百分比为20或甚至更高时,取决于进行预处理过的生物质的类型,液体也可存在。如果加入蒸汽以提高生物质和氨水混合物的温度,部分冷凝的蒸汽可提供加入的含水组分。加入的蒸汽的量 and 导致液体组分的冷凝水的量将取决于包括生物质初始温度、氨水、和反应容器、以及预处理最终温度在内的因素。本领域的技术人员将容易地测定冷凝蒸汽在所用条件下的份额。作为另外一种选择或除此之外,也可存在洗涤步骤,其中例如在与氨水反应后将水加入生物质中,释放的抑制剂溶解于此加入的水中。

[0055] 溶解的抑制剂可以是对糖化和/或发酵有害的任何化合物,它们从低浓度氨水处理过的生物质中释放出来。抑制剂主要组分中的乙酸是发酵的抑制剂,它和乙酰胺存在于生物质预处理液体中。这些化合物存在于液体中,其含量为能从生物质样本中释放的乙酸和乙酰胺理论量的约10%。乙酸和乙酰胺一些类型的细菌细胞的强生长抑制剂。例如,乙酸是生产发酵中普遍生长的大肠杆菌的抑制剂。另一个实例是乙醇生产发酵使用的一种细菌,发酵单胞菌。

[0056] 可通过本领域技术人员熟知的方法如排出、滗析、离心、吸出、和/或过滤移除生物质预处理液体以将其从预处理固体中分离。此外可挤压生物质以释放并移除液体。当挤压生物质移除液体时,优选不将生物质压实,使其在糖化期间性能更好。

[0057] 在移除生物质预处理液体后,在糖化或同步糖化和发酵(SSF)中使用剩余的预处理过的生物质产品。为了从生物质中获得足够量的糖,可以用氨水溶液预处理过的生物质一次或多次。同样地,糖化反应可进行一次或多次。如果需要,可重复预处理和糖化方法以获得更高的糖收率。为了分开地或一起地评估预处理和糖化方法的性能,可测定来源于起始生物质的糖的理论收率并与测量收率进行比较。

[0058] 糖化

[0059] 依照本发明的方法制备的改善的预处理过的生物质然后在存在糖化酶聚生体的条件下进一步水解以释放水解产物中的低聚糖和/或单糖。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. (2002) 66:506-577)。

[0060] 在糖化之前,可处理经预处理过的生物质以改变pH、组合物或温度使得糖化酶聚生体中的酶将有活性。可通过加入固体或液体形式的酸改变pH。作为另外一种选择,可利用可从发酵中回收的二氧化碳(CO₂)降低pH。例如,如果存在足够液体,可从发酵罐中收集CO₂

并将其通入闪蒸槽中的预处理产物顶部空间或起泡通过预处理过的生物质,同时监控pH直至达到所需的pH。可使温度达到下文提到的适合糖化酶活性的温度。可加入糖化过程中使用的酶活性所需的任何辅因子。

[0061] 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、单糖、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) and Supplement 5 [分别在Eur.J.Biochem. (1994) 223:1-5,Eur.J.Biochem. (1995) 232:1-6,Eur.J.Biochem. (1996) 237:1-5,Eur.J.Biochem. (1997) 250:1-6,和Eur.J.Biochem. (1999) 264:610-650中])。本发明的方法中可用的糖苷酶能根据它们水解的生物质组分进行分类。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。

[0062] 糖化酶可商业获取,如获取自 **Spezyme[®]** CP的纤维素酶(Genencor International,Rochester,NY)和 **Multifect[®]**的木聚糖酶(Genencor)。此外,糖化酶可通过生物方法制备,包括使用重组微生物方法。

[0063] 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。

[0064] 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℃至约100℃的范围内。在另一个实施方案中,最佳温度在约20℃至约80℃的范围内。最佳pH可在约2至约11的范围内。另一个实施方案中,在本发明的方法中糖化酶聚生体使用的最佳pH在约4至约10的范围内。

[0065] 糖化可进行约若干分钟至约120小时,优选地约若干分钟至约48小时。反应时间将取决于酶浓度和比活性,已经使用的底物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。

[0066] 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/或温度下执行,或在不同pH和温度下执行,例如使

用在较高pH和温度下稳定的和活性更高的半纤维素酶处理,随后用在较低pH和温度下有活性的纤维素酶处理。

[0067] 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,还原糖的浓度能使用1,3-二硝基水杨酸(DNS)检测分析法(Miller,G.L.,Anal.Chem.(1959) 31:426-428)进行测定。作为另外一种选择,如本文在一般方法部分所述,能通过HPLC,使用合适柱测量糖。

[0068] 发酵

[0069] 合适的微生物能够使用生物质释放的可发酵糖生产目标化学制品。在糖化之后,但是在发酵之前,可通过例如蒸发浓缩糖化混合物以提高可发酵糖的浓度。任选地,在糖化产物中的液体可从分批或连续方法中的固体中分离。任选地,液体或全部糖化产物可在发酵前灭菌。取决于发酵期间使用的微生物和糖化期间使用的pH,可将pH调节到适于发酵的水平。此外,可用微生物生长所需的附加营养物质补充糖化混合物。补充剂可包括例如酵母提取物、特定氨基酸、磷酸盐、氮源、盐、和痕量元素。也可包括通过特定生物催化剂生产特定产品所需的组分,如用于保留质粒的抗生素或酶催化反应所需的辅因子。也可包括附加的糖以提高总糖浓度。可使用糖化混合物作为发酵肉汤的组分,例如,制备介于约100%和约10%之间的最终培养基。

[0070] 取决于发酵微生物使用的条件,也可调节温度和/或顶部空间气体。发酵可以是有氧的或厌氧的。发酵可以在糖化之后发生,或可以通过同步糖化和发酵(SSF)与糖化同时发生。SSF能够使糖化生产的糖含量保持低水平,因此减少潜在的糖化酶产物抑制、减少污染微生物的糖可用性、并改善预处理过的生物质到单糖和/或低聚糖的转化。

[0071] 可通过生物催化剂发酵制备的目标化学制品包括例如酸、醇、烷烃、烯烃、芳族、醛、酮、生物高聚物、蛋白质、肽、氨基酸、维生素、抗生素、和药物。醇包括但不限于甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇、乙二醇、丙二醇、丁二醇、甘油、赤藓醇、木糖醇、和山梨醇。酸包括乙酸、乳酸、丙酸、3-羟基丙酸、丁酸、葡糖酸、衣康酸、柠檬酸、琥珀酸和乙酰丙酸。氨基酸包括谷氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。附加的目标化学制品包括甲烷、乙烯、丙酮和工业化酶。

[0072] 可通过一种或多种合适的生物催化剂在一步或多步发酵中把糖发酵成目标化学制品。生物催化剂可以是选自细菌、丝状真菌和酵母的微生物。生物催化剂可以是野生型微生物或重组微生物,并包括埃希氏菌属、发酵单胞菌、糖酵母属、假丝酵母属、毕赤酵母属、链霉菌属、芽孢杆菌属、乳酸杆菌、和梭菌属。在另一个实施方案中,生物催化剂可以选自重组大肠杆菌、运动发酵单胞菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、啤酒糖酵母、嗜热梭菌、高温产氢菌、和树干毕赤酵母。

[0073] 已经描述了多种用于发酵生产目标化学制品的生物催化剂,并可发现、通过突变生产、或通过重组方法工程化其他生物催化剂。任何使用利用本发明的体系糖化预处理过的生物质生产的可发酵糖的生物催化剂可以被用于制备已知可通过发酵生产的目标化学制品。

[0074] 生产包括乙醇和丁醇在内的生物燃料的生物催化剂是尤其受关注的。例如,通过产溶剂梭菌将碳水化合物发酵成丙酮、丁醇、和乙醇(ABE发酵)是为人熟知的(Jones和Woods(1986)Microbiol.Rev.50:484-524)。US 5192673描述了用于使用丙酮丁醇梭菌突变

株生产高含量丁醇、丙酮和乙醇的发酵方法。US 6358717描述了用于使用拜氏梭菌突变株生产高含量丁醇、丙酮和乙醇的方法。共有的和共同未决的专利申请WO 2007/041269和WO 2007/050671分别公开了遗传工程的微生物宿主中生产1-丁醇和异丁醇。共有的和共同未决的美国专利申请#11/741892和#11/741916公开了遗传工程的微生物宿主中生产2-丁醇。通过微生物宿主按照公开的方法可以从使用本发明系统生产的水解产物中发酵生产异丁醇、1-丁醇或2-丁醇。

[0075] 已经使用遗传修饰的大肠杆菌菌株作为乙醇生产的生物催化剂 (Underwood等人, (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68:6263-6272)。在US 2003/0162271 A1中描述了已经改善了乙醇生产的遗传修饰运动发酵单胞菌菌株。在共有的和共同未决的美国专利申请60/847813和60/847856中分别描述了用于乙醇生产的进一步工程化的运动发酵单胞菌乙醇生产菌株及其作用。通过运动发酵单胞菌按照公开的方法可以从使用本发明的系统生产的水解产物中发酵生产乙醇。在本文实施例4中举例说明把具有包含移除抑制剂的预处理液体的预处理过的生物质糖化成可发酵糖,随后将所述糖发酵成目标化学制品用于从预处理玉米芯中生产乙醇,使用运动发酵单胞菌作为将糖发酵成乙醇的生物催化剂。

[0076] 通过大肠杆菌重组菌株 (Zhou等人, (2003) Appl. Environ. Microbiol. 69:399-407)、芽孢杆菌属天然菌株 (US20050250192)、和米根霉 (Tay和Yang (2002) Biotechnol. Bioeng. 80:1-12) 在发酵过程中生产乳酸。已经使用大肠杆菌重组菌株作为生物催化剂在发酵中生产1,3-丙二醇 (US 6013494, US 6514733) 和己二酸 (Niu等人, (2002) Biotechnol. Prog. 18:201-211)。使用重组梭菌 (Cheryan等人, (1997) Adv. Appl. Microbiol. 43:1-33) 和新鉴定的酵母菌株 (Freer (2002) World J. Microbiol. Biotechnol. 18:271-275) 通过发酵制备乙酸。在US 6159738中公开了通过重组大肠杆菌和其他细菌生产琥珀酸,在Lin等人, (2005) Metab. Eng. 7:116-127) 中公开了通过突变型重组大肠杆菌生产琥珀酸。已经通过光滑球拟酵母突变株 (Li等人, (2001) Appl. Microbiol. Technol. 55:680-685) 和大肠杆菌突变株 (Yokota等人, (1994) Biosci. Biotech. Biochem. 58:2164-2167) 制备了丙酮酸。已经使用大肠杆菌重组菌株作为生物催化剂用于生产对-羟基肉桂酸 (US20030170834) 和奎尼酸 (US20060003429)。

[0077] 已经在发酵过程中使用丙酸丙酸杆菌突变株生产丙酸 (Suwannakham和Yang (2005) Biotechnol. Bioeng. 91:325-337), 并已经使用酪丁酸梭菌制备丁酸 (Wu和Yang (2003) Biotechnol. Bioeng. 82:93-102)。已经通过发酵从梭菌属菌株17cr1 (Janssen (2004) Arch. Microbiol. 182:482-486) 的苏氨酸中制备了丙酸盐和丙醇。已经使用酵母样普鲁兰出芽短梗霉 (Anantassiadis等人, (2005) Biotechnol. Bioeng. 91:494-501), 通过曲霉菌曲霉突变株 (Singh等人, (2001) Indian J. Exp. Biol. 39:1136-43) 制备葡糖酸。通过氧化葡糖酸杆菌突变株制备5-酮基-D-葡糖酸 (Elfari等人, (2005) Appl. Microbiol. Biotech. 66:668-674), 通过土曲霉突变株制备衣康酸 (Reddy和Singh (2002) Bioresour. Technol. 85:69-71), 通过曲霉菌曲霉突变株生产柠檬酸 (Ikram-Ul-Haq等人, (2005) Bioresour. Technol. 96:645-648), 并通过高里假丝酵母FTI 20037生产木糖醇 (Mussatto和Roberto (2003) J. Appl. Microbiol. 95:331-337)。通过重组红串红球菌和富养罗尔斯通氏菌 (Gorenflo等人, (2001) Biomacromolecules 2:45-57) 生产包含4-羟基戊酸乙酯和显著量3-羟基丁酸和3-羟基戊酸的生物聚酯。通过重组大肠杆菌 (Ui等人, (2004)

Lett. Appl. Microbiol. 39:533-537) 制备L-2,3-丁二醇。

[0078] 可通过使用棒状杆菌、短杆菌、和沙雷氏菌的营养缺陷型菌株和氨基酸类似物抗性菌株发酵生产氨基酸。例如,日本专利公布56008596描述了使用组氨酸类似物抗性菌株生产组氨酸,EP 136359描述了使用重组菌株生产组氨酸。日本专利公布47004505和51019037描述了使用色氨酸类似物抗性菌株生产色氨酸。日本专利公布47038995、51006237、54032070描述了使用异亮氨酸类似物抗性菌株生产异亮氨酸。日本专利公布56010035描述了使用苯丙氨酸类似物抗性菌株生产苯丙氨酸。已经描述了使用需要苯丙氨酸生长的酪氨酸抗性菌株 (Agr. Chem. Soc. Japan 50 (1) R79-R87 (1976), 或重组菌株 (EP263515, EP332234) 生产酪氨酸,以及使用L-精氨酸类似物抗性菌株生产精氨酸 (Agr. Biol. Chem. (1972) 36:1675-1684, 日本专利公布54037235和57150381)。也通过在大肠杆菌菌株ATCC 31882、31883、和31884中通过发酵生产苯丙氨酸。US 6962805描述了在重组棒状杆菌中生产谷氨酸。在Okamoto和Ikeda (2000) J. Biosci Bioeng 89:87-79中描述了通过大肠杆菌突变株生产苏氨酸。通过百合棒状杆菌突变株生产甲硫氨酸 (Kumar等人, (2005) Bioresour. Technol. 96:287-294)。

[0079] 通过生物催化剂也已经制备出有用的肽、酶、和其他蛋白质 (例如参见US6861237、US6777207、US6228630)。

[0080] 本发明的方法也可用于从生物质中生产1,3-丙二醇。已经使用大肠杆菌重组菌株作为生物催化剂在发酵中生产1,3-丙二醇 (US 6013494, US 6514733)。如共有的和共同未决的美国专利申请#11/403087的实施例10所述,使用本发明的体系预处理过的生物质可进行糖化;在糖化后,使用大肠杆菌生产1,3-丙二醇。

[0081] 通过生物催化剂在发酵过程中制备的目标化学制品可使用多种本领域已知的方法进行回收。可通过离心、过滤、微量过滤、和纳滤从其他发酵组分中分离产品。可通过离子交换、溶剂萃取、或电透析提取产品。可使用絮凝剂帮助产品分离。一个具体实例是可使用ABE发酵领域已知的方法从发酵培养基中分离生物生产的1-丁醇 (参见例如Durre, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:639-648 (1998), Groot等人, Process. Biochem. 27:61-75 (1992), 以及本文参考)。例如,可通过离心、过滤、透析等方法从发酵培养基中移除固体。然后,可使用诸如蒸馏、共沸蒸馏、液液萃取、吸附、汽提、膜蒸发、或全蒸发的方法从发酵培养基中分离1-丁醇。通过使反应混合物经过有机溶剂、蒸馏、和柱层析提取,可以从发酵培养基中纯化1,3-丙二醇 (美国专利5,356,812)。就此方法而言尤其好的一种有机溶剂是环己烷 (美国专利5,008,473)。氨基酸可以通过如离子交换树脂吸附和/或结晶的方法从发酵培养基中收集。

[0082] 实施例

[0083] 一般方法和材料

[0084] 使用了以下缩写:

[0085] “HPLC”是高效液相色谱,“C”是摄氏度,“kPa”是千帕斯卡,“m”是米,“mm”是毫米,“kW”是千瓦,“μm”是微米,“μL”是微升,“mL”是毫升,“L”是升,“min”是分钟,“mM”是毫摩尔,“cm”是厘米,“g”是克,“kg”是千克,“wt”是重量,“hr”是小时,“temp”或“T”是温度,“theoret”是理论,“pretreat”是预处理,“DWB”是生物质的干重,“ASME”是美国机械工程师学会 (American Society of Mechanical Engineers), “s.s.”是不锈钢。

[0086] 硫酸、氢氧化铵、乙酸、乙酰胺、酵母提取物、葡萄糖、木糖、山梨醇、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、磷酸和柠檬酸从Sigma-Aldrich (St.Louis,MO) 商购获得。

[0087] Jaygo反应器

[0088] Jaygo反应器是一种130升(大约51cm直径×91cm长度),卧式桨叶型反应器(Jaygo Manufacturing, Inc., Mahwah, NJ), **Hastelloy**[®] C-22合金加工。该反应器配备有蒸汽夹套,能够加热至大约177℃(862kPa)。也可直接注入蒸汽以使生物质迅速达到预处理温度。调节并控制汽压以保持所需的预处理温度。多个端口允许注入其他溶剂和热液体。

[0089] 大型筒式活塞反应器

[0090] 大型筒式活塞反应器(印有代码ASME)由配备有水平取向活塞的5.1cm×68.6cm的不锈钢圆筒组成。用四个O形环将活塞密封到筒上,并在排放期间在活塞背面用氮气给活塞加压。68.6cm的圆筒配备有八个多用途端口,沿着顶部表面和底部表面各4个,它们允许应用真空、氨水注射、蒸汽注射、和插入热电偶来测量筒内温度。反应器圆筒配备有蒸汽夹套用于圆筒的均匀加热。将反应器圆筒直接连接到垂直取向的15.2cm×61cm的不锈钢闪蒸槽上。通过锥形喷嘴和底座末端剪切阀排列从闪蒸槽上分离圆筒。末端阀剪切模具的直径是3.5cm。锥形喷嘴和底座上的背压是可调的,大多数测试使用~138kPa(测量压力)的背压进行,使其进入10.2cm直径的空气圆筒中,该圆筒与末端剪切阀的锥形嘴相连。末端剪切阀门的锥形嘴能缩回最多1.6cm,允许排放闪蒸槽中的颗粒。在末端剪切阀出口的弯管引导预处理固体向下进入闪蒸槽的底部,其中所述固体可通过打开槽底部的圆顶螺栓轻易移除。闪蒸槽的上部汽室凸缘加入一个具有被加工成与闪蒸槽轴线呈直角的狭槽的特殊出口,这引起释放的蒸汽沿着拐角路径进入排出装置,有助于防止产生的生物质颗粒遗留和水滴进入排气冷凝器。沿着闪蒸槽加上三个带状电加热器(设为60℃)和绝缘物,使得热预处理的固体闪蒸到加热容器中,以便更好地模拟商业规模的方法。

[0091] 分批补料糖化反应器

[0092] 该反应器在共有的和共同未决的美国专利申请CL3873中进行了详细描述。

[0093] 分批补料糖化反应器是一个15L发酵罐(B.Braun Biotech International, Allentown, PA),通过BioStat ED数据控制单位对其进行控制,并且关联控制模块,所述模块包含循环泵、酸泵和碱泵、螺线管阀门、用于温度控制的换热器、蒸汽供应、处理水、供气控制阀门和过滤、和背压控制阀门以及排气过滤器。该发酵罐配备有两个11.4cm直径的三叶高效Lightnin A-310叶轮。底部叶轮距反应器底部7.6cm(它不能更靠近底部,因为靠近轴底部存在一个大的密封件系统用于底部-传动轴渗透),上部叶轮距反应器底部22.9cm。该发酵罐容器具有19.0cm的直径和55.9cm的最大高度。安装四个可移除的导流板,每个导流板具有1.6cm的宽度和48.3cm的长度,并且从容器底部至顶部~7.6cm。将由APV凸轮泵(M1/028/06型)、1-1/2-英寸(3.81cm)的挠性软管和特氟隆流动观测指示器组成的泵循环回路接到发酵罐系统的顶部和底部端口上。泵循环回路用具有CF8M阀体、316s.s.球体、和PTFE底座的1-1/2英寸(3.81cm)Valmicro和SVF全端口球形阀从发酵容器上分离。此外,V形端口剪切阀(Triac控制)位于凸轮泵下游,在将泵从发酵罐顶部端口分离的球形阀之前。在再循环期间,该阀门逐渐接近最多60°以提供更大的再循环预处理固体剪切。

[0094] 分析方法

[0095] 定量固体中的葡萄糖和木糖

[0096] 使用本领域熟知的方法如ASTM E1758-01“Standard method for the determination of carbohydrates by HPLC”测定在每个起始生物质样本中的葡萄糖和木糖的量。

[0097] 测量可溶性糖、乙酰胺、乳酸、和乙酸含量

[0098] 通过HPLC (Agilent Model 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 使用 Bio-Rad HPX-87P 和 Bio-Rad HPX-87H 柱 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 以及合适的保护柱测量糖化液体或发酵肉汤中的可溶性糖 (葡萄糖、纤维二糖、木糖、半乳糖、阿拉伯糖、和甘露糖)、乙酸、和乙醇。如需要的话, 测量样本 pH 并用硫酸将其调节到 5 至 6。然后使样本通过 0.2 μ m 的注射过滤器直接进入 HPLC 小瓶。HPLC 运行条件如下:

[0099] HPX-87P (用于碳水化合物):

[0100] 注射体积: 10–50 μ L, 取决于浓度和检测器限制

[0101] 流动相: HPLC 级水, 0.2 μ m, 过滤并脱气

[0102] 流速: 0.6 mL/分钟

[0103] 柱温: 80–85 $^{\circ}$ C, 保护柱柱温 < 60 $^{\circ}$ C

[0104] 检测器温度: 尽可能的接近主要柱柱温

[0105] 检测器: 折射指数

[0106] 运行时间: 35 分钟数据采集时间加上 15 分钟运行后时间 (对后来的洗脱化合物进行可能的调节)

[0107] Biorad Aminex HPX-87H (用于碳水化合物、乙酸和乙醇)

[0108] 注射体积: 5–10 μ L, 取决于浓度和检测器限制

[0109] 流动相: 0.01N 硫酸, 0.2 μ m, 过滤并脱气

[0110] 流速: 0.6 mL/分钟

[0111] 柱温: 55 $^{\circ}$ C

[0112] 检测器温度: 尽可能的接近柱温

[0113] 检测器: 折射指数

[0114] 运行时间: 25 至 75 分钟的数据采集时间

[0115] 运行结束后, 根据标准曲线测定每个化合物在样本中的浓度。

[0116] 实施例 1

[0117] 在低温预处理后的微量糖溶解

[0118] 将完整的或破碎玉米芯 (大约 13 kg, 基于干重) 装入到 Jaygo 反应器中。玉米芯通过配备有 C-2975 板的盘式精炼器进行破碎 (一般方法)。所得破碎玉米芯通过一个 1.27 cm 的筛网。任何保留下来的小块再次通过具有 0.5 cm 的更小间隙的盘式精炼器。对反应器施加真空, 并注射稀释氢氧化铵溶液以提供所需的氨终浓度 (2% 或 6% wt NH₃/wt 干生物质) 和干生物质浓度 (30% 或 40% wt 干生物质/wt 总生物质-氨水混合物)。在完整玉米芯的情况下, 氨初始浓度是 6% (wt/wt 干生物质), 干生物质浓度是 40%。就破碎玉米芯而言, 氨初始浓度是 2% (wt/wt 干生物质), 干生物质浓度是 30%。当浸泡时减少真空度并施用蒸汽于夹套上以加热完整玉米芯样本至 93 $^{\circ}$ C, 加热破碎玉米芯样本至 85 $^{\circ}$ C。施用短时间内提高的搅拌速度 (最多 96 rpm) 以提高加热速率。在该温度下, 以 32 rpm 的恒速混合保持浸泡的完整玉米芯 8 小时, 保持浸泡的破碎玉米芯 4 小时, 然后持续混合冷却过夜。在从反应器中移除预处理过

的生物质之前,将反应器在90℃下置于真空以从预处理过的生物质中去除氨。

[0119] 如一般方法所述分析完整玉米芯预处理过的生物质混合物的固相和液相组合物,结果在表1中给出。量以起始生物质中的理论量%形式给出,乙酸和乙酰胺一起对应于生物质中的乙酰基。在固体中剩余了大量葡萄糖和木糖(分别在纤维素和半纤维素中),在液体中仅测量到少量可溶性低聚物。所有给料乙酰基以乙酸或乙酰胺形式存在于液相中。

[0120] 表1:将低温预处理完整玉米芯之后的不同给料组分分配到固相或液相。

[0121]

组分	固相: 理论给料值%	液相: 理论给料值%			
		糖单体	糖低聚物	乙酸	乙酰胺
葡萄糖	99	0	1	-	-
木糖	83	0	7*I	-	-
乙酰基	0	-	-	56	44

[0122] *由于检测分析的灵敏度水平,总值可以不是100

[0123] 如一般方法所述分析破碎玉米芯预处理过的生物质混合物的固相和液相组合物,结果在表2中给出。量以起始生物质中的理论量%形式给出,乙酸和乙酰胺一起对应于生物质中的乙酰基。关于完整玉米芯的预处理过的生物质,在固体中剩余了大量葡萄糖和木糖(分别在纤维素和半纤维素中),在液体中仅测量到少量可溶性低聚物。所有给料乙酰基也以乙酸或乙酰胺形式存在于液相中。

[0124] 表2:将低温预处理破碎玉米芯之后的不同给料组分分配到固相或液相。

[0125]

组分	固相: 理论给料值%	液相: 理论给料值%			
		糖单体	糖低聚物	乙酸	乙酰胺
葡萄糖	97	2	2*	-	-
木糖	92		1*	-	-
乙酰基	0	-	-	81	9*

[0126] *由于检测分析的灵敏度水平,总值可以不是100

[0127] 实施例2

[0128] 在高温预处理后的微量糖溶解

[0129] 将如实施例1所述制备的破碎玉米芯(13kg,干燥基)装入Jaygo反应器中。在反应器抽真空后,在室温下,以32rpm的搅拌速度,将提供2%氨(wt/wt干生物质)的合适强度的氢氧化铵溶液和30%干重浓度的生物质泵入到反应器中。然后使用低压夹套蒸汽将反应器内容物加热至95℃。当反应器达到95℃之后,直接注入蒸汽以将反应器内容物加热至145℃。当反应器达到145℃时,使用夹套蒸汽和一些直接注入蒸汽使反应器内容物保持该温度20分钟。在20分钟后,在排气口对反应器抽真空并开启破碎机马达5分钟。在1小时后开启冷却水至夹套中。将Jaygo反应器的内容物冷却至介于33℃和37℃之间;然后使用CO₂以将反

反应器加压至138kPa。保持加压CO₂气体30分钟。反应器内容物的最终温度介于27℃至31℃之间。浸泡的/预处理过的生物质的pH为大约7.5。

[0130] 如一般方法所述分析处理生物质混合物的固相和液相组合物,结果在表3中给出。量以起始生物质中的理论量%形式给出,乙酸和乙酰胺一起对应于生物质中的乙酰基。关于实施例1中的低温预处理过的生物质,在固体中剩余了大量葡萄糖和木糖(分别在纤维素和半纤维素中),在液体中仅测量到少量可溶性低聚物。所有给料乙酰基也以乙酸或乙酰胺形式存在于液相中。

[0131] 表3:将高温预处理破碎玉米芯之后的不同给料组分分配到固相或液相。

[0132]

组分	固相: 理论给料值%	液相: 理论给料值%			
		糖单体	糖低聚物	乙酸	乙酰胺
葡萄糖	100	0	2*	-	-
木糖	93	0	2*	-	-
乙酰基	0	-	-	90	9*

[0133] *由于检测分析的灵敏度水平,总值可以不是100

[0134] 实施例3

[0135] 预处理包含发酵抑制剂的液体

[0136] 如下所述,在大型筒式活塞反应器中进行一系列预处理(如一般方法所述)。将蒸汽加到圆筒夹套中将大型筒式活塞反应器的圆筒(如一般方法所述)预热到~130℃。用带状加热器将闪蒸接收器预热到~60℃。用颚间距为大约0.95cm的颚式粉碎机(2.2kW马达)处理完整玉米芯,然后用破碎机(1.5kW马达, Franklin Miller Inc., Livingston, NJ)处理,随后用配备1.9cm美国标准筛网的Sweco筛网进行筛分,使完整玉米芯破碎成更小的块。用手将这些破碎后的玉米芯(175g,基于干重)装入大型筒式反应器,置于移除活塞的反应器末端。把活塞放回原处以堵上末端。将反应容器和闪蒸接收器抽真空以减压至<10kPa,将稀释氢氧化铵溶液注入到反应器中,使氨浓度为6g/100g生物质的干重,生物质的干重浓度为45g/100g总生物质氨水混合物。注入氨之后,将蒸汽注入反应器中以将温度升至145℃。通过监控温度以及如需要的话注入蒸汽,使混合物保持该温度10分钟,然后开启活塞将其排入预热闪蒸槽中。将闪蒸槽抽真空直至闪蒸接收器达到~59℃。就系列A而言,进行12次此类预处理,就系列B而言,进行13次此类预处理。移除闪蒸槽底部以收获固体。从固体中排出任何过多的液体,并将从每个预处理系列中收集的所有液体混合在一起。如一般方法所述,分析此液体的糖含量、乙酸和乙酰胺。如表4和5所示,液体当包含较多乙酸和乙酰胺时其糖含量非常低。

[0137] 表4:在预处理液体中移除的糖。

[0138]

预处理系列	葡萄糖单体: 理论值%	总葡萄糖: 理论值%	木糖单体: 理论值%	总木糖: 理论值%
A	0.02%	0.15%	0	0.12%
B	0	0.13%	0	0.11%

[0139] 表5:在预处理液体中移除的乙酸和乙酰胺。

[0140]

预处理系列	乙酸%理论值	乙酰胺%理论值
A	6.2%	1.8%
B	10.2%	2.7%

[0141] 实施例4

[0142] 使用来自移除液体中抑制剂的预处理过的生物质的糖化水解产物生产乙醇

[0143] 将蒸汽加到圆筒夹套中将大型筒式活塞反应器的圆筒(如一般方法所述)预热到 $\sim 130^{\circ}\text{C}$ 。用带状加热器将闪蒸接收器预热到 $\sim 60^{\circ}\text{C}$ 。如下所述制备破碎玉米芯。用颚间距为大约0.95cm的颚式粉碎机(2.2kW马达)处理完整玉米芯,然后用破碎机(1.5kW马达, Franklin Miller Inc., Livingston, NJ)处理,随后用配备1.9cm美国标准筛网的Sweco筛网进行筛分,使完整玉米芯破碎成更小的块。用手将这些处理后的玉米芯(175g,基于干重)装入大型筒式活塞反应器,置于移除活塞的反应器末端。把活塞放回原处以堵上末端。将反应容器和闪蒸接收器抽真空以减压到 $< 10\text{kPa}$,将稀释氢氧化铵溶液注入反应器中,使氨浓度为6g/100g生物质的干重,生物质的干重浓度为45g/100g总生物质氨水混合物。注入氨之后,将蒸汽注入反应器中以将温度升至 145°C 。通过监控温度以及如需要的话注入蒸汽,使混合物保持该温度10分钟,然后开启活塞将其排入预热闪蒸槽中。将闪蒸槽抽真空直至闪蒸接收器达到 $\sim 59^{\circ}\text{C}$ 。当从闪蒸接收器收获产品时,将游离液体从预处理固体中分离出来,并且不把它们再加回去用于糖化。进行总共17次此类预处理。注入来自4次预处理的预处理玉米芯用于糖化以提供用于分批补料糖化的初始水解产物。注入来自剩余13次生产运行的预处理玉米芯用于分批补料糖化。

[0144] 为了开始分批补料糖化,在如一般方法所述的分批补料糖化反应器中首先加入水解产物以装满反应器第一叶轮的底部。该水解产物通过在2.8L摇瓶中糖化预处理玉米芯进行制备。这些摇瓶装入465g预处理固体,1000mL去离子水,以及28.4mg **Spezyme**[®] CP/g纤维素和4.2mg活性蛋白/g纤维素的半纤维素酶聚生体(Diversa, San Diego, CA),该酶聚生体包括 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、 β -木糖苷酶和阿拉伯糖苷酶。在加入酶之前,用8.5% H_3PO_4 将pH调节到5。将摇瓶保持在 50°C 并在旋转振荡器中以150rpm振荡48小时,此时将水解产物装入分批补料反应器。

[0145] 加入了初始水解产物之后,将预处理过的生物质-氨混合物($\sim 700\text{g}$)的第一等分试样加入反应器中。加入8.5% H_3PO_4 将pH保持设定值5.5。将pH再调节到设定值之后,加入28.4mg **Spezyme**[®] CP/g纤维素和4.2mg活性蛋白/g纤维素的半纤维素酶聚生体(Diversa),该酶聚生体包括 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、 β -木糖苷酶和阿拉伯糖苷酶。在 $t =$

4、8、12、22、26、30和34小时加入预处理过的生物质-氨混合物的附加等分试样、**Spezyme[®]** CP纤维素酶和半纤维素酶聚生体。一般在加入酶约1小时后开启泵循环回路,并运行约1小时直至在第22小时加入固体。在26小时和30小时加料后,在加入酶后约50分钟开启泵并运行30分钟。在34小时加料后,在加入酶后约3小时开启泵并运行30分钟。泵也在 $t=29$ 、33、47和49小时运行30分钟。总糖化时间为120小时。此时水解产物包含~60g/L葡萄糖单体、25g/L木糖单体和10g/L乙酸。

[0146] 该水解产物用于运动发酵单胞菌菌株ZW800或ZW658 (ATCC#PTA-7858) 发酵。ZW658是运动发酵单胞菌菌株,它已经被工程化用于将木糖发酵成乙醇,在共有的和共同未决的美国专利申请60/847813中对此进行了描述,该专利申请以引用方式并入本文。ZW658通过经由序贯转座事件将两个操纵子整合到ZW1 (ATCC#31821) 基因组中,然后通过包含木糖的选择培养基筛选进行构建,所述操纵子是 $P_{gapxy1AB}$ 和 $P_{gaptal1tk}$,它们包含四个编码木糖异构酶、木酮糖激酶、转醛醇酶和转酮醇酶的木糖利用基因。ZW800是具有编码葡萄糖-果糖氧化还原酶灭活基因的ZW658菌株,它也在共有的和共同未决的美国专利申请60/847813中进行了描述。

[0147] 发酵在灭菌的1升发酵罐(**BIOSTAT[®]** B-DCU系统,Sartorius BBI System Inc.,Bethlehem,Pennsylvania,USA) 中进行,初始工作体积为500mL。将种菌加入发酵罐中,含量为10% (v/v),使得加样后肉汤的 $OD_{600} \sim 1$ 。水解产物与水的平衡比例为80%或40% (v/v)。加入附加葡萄糖和木糖以使它们在肉汤中的终浓度分别为92g/L和82g/L。肉汤也补充有10mm山梨醇和1g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 。在33°C, pH 5.8,搅拌速度150rpm的条件下进行72小时的发酵。ZW800菌株的最终乙醇滴定度为在40%的水解产物中8g/L,在80%的水解产物中7g/L。ZW658的最终乙醇滴定度为在40%的水解产物中8g/L,在80%的水解产物中6.5g/L。