



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103314112 B

(45)授权公告日 2017.08.04

(21)申请号 201180050802.8

(22)申请日 2011.10.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103314112 A

(43)申请公布日 2013.09.18

(30)优先权数据

2010A001951 2010.10.22 IT

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.04.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/068043 2011.10.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/052368 EN 2012.04.26

(73)专利权人 艾尼股份公司

地址 意大利罗马

(72)发明人 吉尔里安纳·弗兰佐希

弗朗西斯卡·皮萨

丹妮拉·古澈蒂 丹尼尔·比安奇

康瑟塔·马拉·康姆佩格诺

西尔维娅·格拉法希

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东

(51)Int.Cl.

C12P 7/64(2006.01)

(56)对比文件

WO 2010069516 A2,2010.06.24,

CN 1059560 A,1992.03.18,

WO 2010069516 A2,2010.06.24,

Kootstra.Comparison of dilute mineral
and organic acid pretreatment for
enzymatic.《Biochemical Engineering
Journal》.2009,第46卷(第2期),126-131.

审查员 吕健

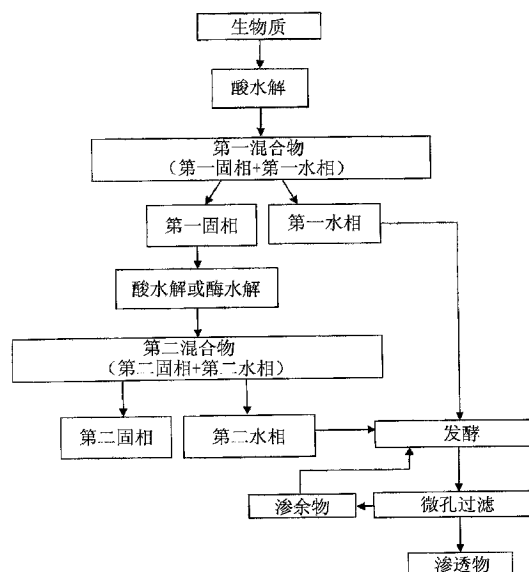
权利要求书2页 说明书14页 附图2页

(54)发明名称

从生物质制备脂类的方法

(57)摘要

从含有多糖类的生物质制备脂类的方法。将生物质经过酸水解以获得第一固相和第一水相。该固相经过酸水解或酶水解,获得另一固相和另一水相。从两个水解步骤获得的水相经过用含油酵母的发酵。获得的发酵液包括含油细胞生物质,含油细胞生物质经过用于分离脂类的微孔过滤。该脂类可用于生物柴油或绿色柴油的制备。



1. 一种从木质纤维素生物质制备脂类的方法,包括:
 - 使所述木质纤维素生物质经过酸水解,获得包括第一固相和第一水相的第一混合物;
 - 在至少一种含油酵母的存在下将所述第一水相进料至发酵装置,获得包括第一含油细胞生物质的第一发酵液,其中所述含油酵母选自:粘红酵母、正红酵母、禾本红酵母、斯达氏油脂酵母、产油油脂酵母、变异三角酵母、乳酒假丝酵母、弯假丝酵母、解脂假丝酵母、球拟酵母或树干毕赤酵母;
 - 使所述第一固相经过酸水解,获得包括第二固相和第二水相的第二混合物;
 - 在所述第一发酵液的存在下将所述第二水相进料至所述发酵装置,获得包括含有脂类的第二含油细胞生物质的第二发酵液;
 - 使至少一部分所述第二发酵液经过微孔过滤,获得渗余物和渗透物;
 - 将所述渗余物进料至所述发酵装置。
2. 根据权利要求1所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述木质纤维素生物质在经过所述酸水解之前经过预研磨过程。
3. 根据权利要求1或2所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述酸水解在至少一种无机酸的存在下进行。
4. 根据权利要求1或2所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中相对于反应混合物的总重量,所述木质纤维素生物质或所述第一固相存在于所述反应混合物中的量为5重量%至20重量%。
5. 根据权利要求3所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述无机酸选自:硫酸、硝酸、盐酸、磷酸、或其混合物。
6. 根据权利要求3所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中相对于水溶液的总重量,所述无机酸存在于所述水溶液中的浓度为0.1重量%至2重量%。
7. 根据权利要求1或2所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述酸水解在140℃至270℃的温度下进行。
8. 根据权利要求1或2所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述酸水解进行的时间为10秒至30分钟。
9. 根据权利要求1所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述第一水相和/或所述第二水相经过用至少一种吸附材料的处理,分别获得第三水相和/或第四水相。
10. 根据权利要求1所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中在被进料至所述发酵装置之前,或在经过用至少一种吸附材料的处理之前,所述第一水相和/或所述第二水相经过通过加入至少一种氧化物和/或至少一种氢氧化物中和。
11. 根据权利要求10所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述至少一种氧化物和/或至少一种氢氧化物为氧化钙、氢氧化钙或氢氧化钡、或其混合物。
12. 根据权利要求9或10所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述用至少一种吸附材料的处理在10℃至150℃的温度下进行。
13. 根据权利要求9或10所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述用至少一种吸附材料的处理在0.5巴至10巴的压力下进行。
14. 根据权利要求9或10所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述用至少一种吸附材料的处理进行的时间为10分钟至6小时。

15. 根据权利要求9或10所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述吸附材料选自具有MFI、MOR、FAU或BEA结构的沸石型的结晶微孔硅酸盐类或金属硅酸盐类。

16. 根据权利要求9或10所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中相对于所述第一水相或所述第二水相的总重量,所述吸附材料加入至所述第一水相和/或所述第二水相的量为0.5重量%至50重量%。

17. 根据权利要求1或2所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述发酵在20℃至40℃的温度下进行。

18. 根据权利要求1或2所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述发酵进行的时间为2天至10天。

19. 根据权利要求1或2所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述发酵在4.5至7的PH下进行。

20. 根据权利要求1或2所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述微孔过滤通过基于再生纤维素的膜、或陶瓷膜进行。

21. 根据权利要求1或2所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述方法包括向所述发酵装置加入2g/l至20g/l的量的玉米浆。

22. 根据权利要求1所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述方法包括使所述包括脂类的第二含油细胞生物质经过热处理。

23. 根据权利要求22所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述热处理在2巴至6.5巴的压力下进行。

24. 根据权利要求22或23所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述热处理在100℃至160℃的温度下进行。

25. 根据权利要求22或23所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述热处理进行的时间为1小时至8小时。

26. 根据权利要求22或23所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述热处理结束时,所述含油细胞生物质经过在至少一种有机溶剂的存在下的提取。

27. 根据权利要求26所述的从木质纤维素生物质制备脂类的方法,其中所述有机溶剂为乙酸乙酯。

从生物质制备脂类的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种从包括至少一种多糖的生物质制备脂类的方法。

[0002] 更具体地,本发明涉及一种从含有至少一种多糖的生物质制备脂类的方法,该方法包括:使该含有至少一种多糖的生物质经过酸水解,获得固相和水相;使该固相经过酸水解或酶水解,获得另一固相和另一水相;在至少一种含油酵母的存在下使从该水解获得的水相经过发酵,获得包括含油细胞生物质的发酵液;使至少一部分该发酵液经过微孔过滤。

[0003] 由此获得的脂类可有利地用于制备生物柴油或绿色柴油,生物柴油或和绿色柴油可以单独地或与其他燃料形成混合物用于机动车辆。

背景技术

[0004] 一般而言,生物质为具有有机的、植物的或动物基质的任意物质,其可用于能源目的,例如作为用于制备生物燃料或可加入至燃料的成分的原材料。因此生物质可以形成作为通常用于制备燃料的源自化石的传统原材料的替代物的可再生能源。为了这个目的,木质纤维素生物质是非常有用的。

[0005] 从生物质、特别是木质纤维素生物质制备糖类,在本领域是已知的。

[0006] 木质纤维素生物质为包括三种主要成分的复合结构:纤维素、半纤维素和木质素。纤维素、半纤维素和木质素的相对量根据使用的木质纤维素生物质的类型变化。例如,在植物的情况下,该量根据植物的种类和年龄变化。

[0007] 纤维素是木质纤维素生物质的最大组分,且相对于木质纤维素生物质的总重量,纤维素通常存在的量为30重量%至60重量%。纤维素由通过 $\alpha\beta$ -1,4葡萄糖苷键相互键合的葡萄糖分子(500至10,000单元)组成。链之间氢键的建立引起给予植物纤维抵抗性和弹性的结晶区域的形成。本质上,纤维素只能以其纯态在诸如棉花或亚麻的一年生植物中发现,而在木本植物中纤维素通常伴随有半纤维素和木质素。

[0008] 相对于木质纤维素生物质的总重量,通常以10重量%至40重量%的量存在的半纤维素作为混合聚合物出现,为相对较短的(10至200分子的)和支化的,由具有六个碳原子的糖类(葡萄糖、甘露糖、半乳糖)和具有五个碳原子的糖类(木糖、阿拉伯糖)组成。植物纤维的一些重要性质是由于半纤维素的存在,半纤维素的主要性质是当水存在时,利于该植物纤维的吸涨,引起植物纤维膨胀。半纤维素还具有粘性且因此趋向于变硬或趋向于产生角质硬度,结果是该植物纤维变硬且吸涨更慢。

[0009] 相对于木质纤维素生物质的总重量,木质素一般存在的量为10重量%至30重量%。木质素的主要功能在于将各种植物纤维相互键合和粘结,给予植物紧密性和抵抗性,且还提供免受昆虫、病原体、损害和紫外光的侵害。木质素主要作为燃料使用,但是目前木质素还作为分散剂、硬化剂、乳化剂在工业上使用,用于塑料薄片、纸板箱和橡胶产品。还可化学处理木质素以制备香草醛类型的、丁香醛类型的、对-羟基苯甲醛类型的芳香族化合物,该芳香族化合物可用于药物化学,或者用于化妆品和食品工业。

[0010] 为了优化木质纤维素生物质向能源用途的产品的转化,已知的是使该木质纤维素

生物质经过预处理以分离木质素,且将纤维素和半纤维素水解为诸如例如葡萄糖和木糖的单糖类。该糖类可以作为碳源在微生物的存在下用于制备醇类和/或脂类的发酵工艺中使用。

[0011] 例如,专利申请US 2008/0102176描述了一种用于提取植物脂肪类的方法,包括:将包含纤维素的原材料磨粉以获得直径为1mm至2mm的颗粒;将颗粒浸入浓度等于1%至2%的硫酸中以酸化该颗粒,以增加纤维素的水解和调节PH值为 4.5 ± 0.5 ;除去被硫酸酸化的颗粒,且依次将纤维素和含油酵母加入酸化的颗粒且在25℃至30℃的温度下和85%至90%的湿度下经过8至9天的发酵;将作为溶剂的脂肪烃加入发酵产物以提取脂肪类,获得提取混合物;除去残留在提取混合物中的酸化的颗粒且通过蒸馏从溶剂中分离脂肪,获得原油。优选地纤维素从绿色木霉(*Trichoderma viride*)获得且含油酵母为粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)。获得的脂肪类酯化之后可转化为生物柴油。

[0012] Dai等在文章“Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity”,发表于“African Journal of Biotechnology”(2007),第6(18)卷,第2130-2134页,中描述了从含油酵母制备生物柴油。在该文章中,木质纤维素生物质被研磨且经过在硫酸的存在下的酸水解。这样获得的糖类作为碳源用于在预选择的粘红酵母菌株的存在下的发酵工艺,特别地该工艺还能够使用戊糖类、木糖,目的是获得可随后通过索式提取法被提取且经过酯交换以获得生物柴油的油类。

[0013] 然而,以上的方法具有各种缺点。

[0014] 用稀硫酸处理木质纤维素生物质(即酸水解)而获得的糖类(特别地,例如葡萄糖)的产率一般很低(例如,低于50%)。此外,从该处理获得的糖类作为碳源在含油酵母的存在下的发酵工艺中的使用始终不能够提供良好的脂类的产率[例如,脂类的产率低于30重量%,该产率以发酵之后获得的含油细胞生物质(干)中存在的脂类的总量计算]。

[0015] 此外,为了从水解中获得良好的糖类的产率和从发酵中获得良好的脂类的产率[例如脂类的产率高于或等于40%,该产率以发酵之后获得的含油细胞生物质(干)中存在的脂类的总量计算],该方法在水解步骤中需要使用高浓度的木质纤维素生物质。高浓度的木质纤维素生物质的使用,特别是在木质纤维素生物质的酸水解的情况下,能导致形成大量的有毒化合物,诸如,例如,糠醛、羟甲基糠醛、酚化合物,这些有毒化合物可作为用于随后糖类的发酵工艺和因此的脂类的生产中通常使用的微生物的生长抑制剂。

发明内容

[0016] 现在申请人发现从含有至少一种多糖的生物质制备脂类可有利地通过一种方法进行,该方法包括:使该含有至少一种多糖的生物质经过酸水解,获得包括固相和水相;使该固相经过酸水解或酶水解,获得另一固相和另一水相;在至少一种含油酵母的存在下使从该水解获得的水相经过发酵,获得包括含油细胞生物质的发酵液;使该发酵液的一部分经过微孔过滤。

[0017] 通过该方法可获得大量的优点。例如,该方法允许获得糖类,特别地是从含有至少一种多糖的生物质的酸水解处理获得的戊糖类,和从该含有至少一种多糖的生物质的酸水解处理获得的固相的酸水解或酶水解处理获得的己糖类,这些糖类可随后作为碳源在用于

制备脂类的发酵方法中在两个不同发酵阶段使用。特别地,从含有至少一种多糖的生物质的酸水解处理获得的戊糖类可用于获得含油细胞生物质的良好的生长,而从含有至少一种多糖的生物质的该酸水解处理获得的固相的酸水解或酶水解处理获得的己糖类可用于增加脂类的产率。此外,微孔过滤至少一部分发酵液允许发酵装置中该发酵液的体积保持恒定,且甚至当进料从含有至少一种多糖的生物质的酸水解、和/或含有至少一种多糖的生物质的该酸水解处理获得的固相的酸水解或酶水解处理获得的糖类的稀释溶液时,允许增加该发酵液中含油细胞生物质的浓度。该方法允许以高产率[例如,脂类的产率高于或等于40%,该产率以发酵之后获得的含油细胞生物质(干)中存在的脂类的总量计算]获得脂类。该脂类可有利地用于生产生物柴油或绿色柴油,生物柴油或绿色柴油可单独地,或其他燃料形成混合物用于机动车辆。

[0018] 因此本发明的一个目的涉及一种从含有至少一种多糖的生物质制备脂类的方法,包括:

[0019] -使该含有至少一种多糖的生物质经过酸水解,获得包括第一固相和第一水相的第一混合物;

[0020] -在至少一种含油酵母的存在下将该第一水相进料至发酵装置,获得包括第一含油细胞生物质的第一发酵液;

[0021] -使该第一固相经过酸水解或酶水解,获得包括第二固相和第二水相的第二混合物;

[0022] -在该第一发酵液的存在下将该第二水相进料至该发酵装置,获得包括包含脂类的第二含油细胞生物质的第二发酵液;

[0023] -使至少一部分该第二发酵液经过微孔过滤,获得渗余物和渗透物;

[0024] -将该渗余物进料至该发酵装置。

[0025] 为了本发明的说明书和以下权利要求的目的,除非另外说明,数值范围的限定总是含有端值。

[0026] 根据本发明的一个优选实施例,该多糖可选自:纤维素、半纤维素、或其混合物。纤维素、或半纤维素与纤维素的混合物为特别优选的。

[0027] 根据本发明的另一个优选实施例,该含有至少一种多糖的生物质为木质纤维素生物质。如上所述,木质纤维素生物质含有三种成分:半纤维素、纤维素和木质素。

[0028] 该木质纤维素生物质优选地选自:

[0029] -为了能源用途特别栽植的作物(例如芒草,小米,常见的甘蔗)的产品,包括作物或其制备过程中的废弃物、残留物和碎屑;

[0030] -农业耕作、造林和森林培育的产品,包括木材,植物,农业加工、造林和森林培育的残留物和废弃物;

[0031] -用于人类营养或动物饲养的农业食品产品的废品;

[0032] -造纸工业中未经化学处理的残留物;

[0033] -来自城市固体垃圾(例如,源自植物、纸的城市垃圾)的分类收集的废品。

[0034] 根据本发明的一个优选实施例,该含有至少一种多糖的生物质在经过该酸水解之前,可经过预研磨过程。该含有至少一种多糖的生物质优选地可研磨直到获得直径为0.1mm至10mm,更优选0.5mm至4mm的颗粒。特别优选地颗粒的直径小于1mm。

[0035] 根据本发明的一个优选实施例,该酸水解可在至少一种无机酸的水溶液的存在下进行。

[0036] 根据本发明的一个优选实施例,相对于反应混合物的总重量,该含有至少一种多糖的生物物质或该第一固相在反应混合物中存在的量可为5重量%至20重量%,优选地10重量%至18重量%。

[0037] 为了本发明的说明书和以下权利要求的目的,术语“反应混合物”是指,在酸水解的情况下,包括该含有至少一种多糖的生物物质或该第一固相和该至少一种无机酸的该水溶液的混合物。

[0038] 为了本发明的说明书和以下权利要求的目的,术语“反应混合物”是指,在酶水解的情况下,包括该第一固相和至少一种酶的水溶液的混合物。

[0039] 根据本发明的一个优选实施例,该无机酸可选自:硫酸、硝酸、盐酸、磷酸、或其混合物。硫酸是优选的。

[0040] 根据本发明的一个优选实施例,相对于水溶液的总重量,该无机酸存在于该水溶液中的浓度为0.1重量%至2重量%,优选地0.3重量%至1重量%。

[0041] 该无机酸作为用于该含有至少一种多糖的生物物质或该第一固相的酸水解的催化剂。特别地,当含有至少一种起始多糖的生物物质为木质纤维素生物物质时,该无机酸具体地作为用于半纤维素的酸水解的催化剂。

[0042] 根据本发明的一个优选实施例,该酸水解可在140℃至270℃,优选地170℃至250℃的温度下进行。

[0043] 根据本发明的一个优选实施例,该酸水解可进行的时间为10秒至30分钟,优选地30秒至20分钟。

[0044] 该酸水解可在本领域已知的反应器中进行,该反应器为诸如,例如,高压釜,或挤出机。

[0045] 该酶水解可根据本领域已知的技术使用商业酶类进行,该技术例如,描述于美国专利US 5,628,830、US 5,916,780和US 6,090,595中,该商业酶类为诸如,例如Celluclast 1.5L (Novozymes)、Econase CE (Rohm Enzymes)、Spezyme (Genecor)、Novozym 188 (Novozymes) (单独地或相互形成混合物使用)。

[0046] 如果该含有至少一种多糖的生物物质或该第一固相经过酸水解,为了减少可作为在随后的发酵和因此的脂类的生产中使用的含油酵母的生长抑制剂的副产物(诸如,例如糠醛、羟甲基糠醛、酚化合物)的量,该第一水相和/或该第二水相可经过用至少一种吸附材料的处理。

[0047] 根据本发明的另一个优选实施例,该第一水相和/或该第二水相可经过用至少一种吸附材料处理,分别获得第三水相和/或第四水相。

[0048] 该第一固相和第一水相,以及该第二固相和第二水相,可通过本领域已知的技术分离,该技术为诸如,例如过滤、离心。这些相优选地通过过滤分离。

[0049] 为了将PH调节至随后发酵可接受的值,有利的是使该第一水相和/或该第二水相经过中和。

[0050] 根据本发明的一个优选实施例,在被进料至发酵装置之前,或在经过用至少一种吸附材料的处理之前,该第一水相和/或该第二水相可经过通过加入至少一种氧化物和/或

至少一种氢氧化物中和,该至少一种氧化物和/或至少一种氢氧化物为诸如,例如,氧化钙、氢氧化物或氢氧化钡、或其混合物。

[0051] 该加入之后形成的盐类可从该第一水相或该第二水相中通过本领域已知的技术分离,该技术为诸如,例如,过滤、离心。该盐类优选地通过过滤分离。

[0052] 该包括木质素的第二固相可升级为燃料,例如用于生产维持含有至少一种多糖的生物质的处理过程所必须的能源的燃料。

[0053] 根据本发明的一个优选实施例,该用至少一种吸附材料的处理可在10℃至150℃的温度、优选地20℃至100℃的温度下进行。

[0054] 根据本发明的一个优选实施例,该用至少一种吸附材料的处理可在0.5巴至10巴的压力、优选地0.8巴至2巴的压力下进行。

[0055] 根据本发明的一个优选实施例,该用至少一种吸附材料的处理进行的时间可为10分钟至6小时、优选地30分钟至5小时。

[0056] 该用至少一种吸附材料的处理结束时,该吸附材料可从该第三水相或该第四水相中通过本领域已知的技术分离,该技术为诸如,例如,过滤、离心。该吸附材料优选地通过过滤分离。

[0057] 为了本发明的说明书和以下权利要求的目的,术语“吸附材料”是指能够通过物理或化学手段(“化学吸附”)将有机物质吸附在其表面的天然的或人造的材料。

[0058] 根据本发明的一个优选实施例,该吸附材料可选自具有例如MFI、MOR、FAU、或BEA结构的沸石型的微孔结晶硅酸盐类或金属硅酸盐类。

[0059] 可有利地用于本发明的目的的沸石型的微孔结晶硅酸盐或金属硅酸盐为Zeolyst International的沸石CBV2314(MFI型,Si/Al比=12)和CBV 28014(MFI型,Si/Al比=140)。

[0060] 根据本发明的一个优选实施例,相对于该第一水相或第二水相的总重量,该吸附材料可加入至该第一水相和/或第二水相的量为0.5重量%至50重量%、优选地3重量%至15重量%。

[0061] 该用至少一种吸附材料的处理可在本领域已知的反应器中进行,该反应器为诸如,例如,搅拌反应器、固定床反应器、浆料反应器。

[0062] 该用至少一种吸附材料的处理可以不同方式进行,该方式为诸如,例如,分批式或连续式。

[0063] 应当指出的是,该用至少一种吸附材料的处理减少了副产物(特别地糠醛、羟甲基糠醛、酚化合物)的含量,该副产物可在该含有至少一种多糖的生物质和/或该第一固相的酸水解过程中形成、如上所述可作为以上发酵和因此脂类的生产中使用的含油酵母的生长抑制剂。特别地,在该用至少一种吸附材料的处理之后,该第三水相和该第四水相的糠醛和羟甲基糠醛的含量低于或等于0.1g/l。

[0064] 还应当指出的是,该用至少一种吸附材料的处理不会引起第一水相或第二水相中存在的碳源的显著降低。相对于该第一水相或第二水相的总有机碳含量(“总有机碳(Total Organic Carbon)”-TOC),通常该第三水相和第四水相的总有机碳(“总有机碳”-TOC)含量分别等于约90%。该总有机碳(“总有机碳”-TOC)通过燃烧由TOC分析器测定,该分析器能够测定总碳含量(“总碳(total carbon)”-TC)和无机碳含量(“无机碳(inorganic carbon)”-IC)的,通过总碳含量(“总碳”-TC)和无机碳含量(“无机碳”-IC)的差计算出总有机碳含量

(“总有机碳”-TOC)。

[0065] 因此应当指出的是,相对于该第一水相或第二水相,第三水相或第四水相中有机材料的含量基本上仍分别不变。

[0066] 根据本发明的一个优选实施例,该第一固相包括木质素和纤维素,且该第一水相包括至少一种具有5至6个碳原子的糖、优选地具有5个碳原子的糖、更优选地木糖,和该无机酸。该木糖优选地从半纤维素的酸水解获得。相对于该第一水相中包含的糖类的总重量,该具有5个碳原子的糖优选地存在于该第一水相中的量高于或等于60重量%。

[0067] 根据本发明的一个优选实施例,该第二固相包括木质素,且该第二水相包括至少一种具有5至6个碳原子的糖、优选地具有6个碳原子的糖、更优选地葡萄糖,和该无机酸或该酶。该葡萄糖优选地从纤维素的酸水解或酶水解获得。相对于该第二水相中包含的糖类的总重量,该具有6个碳原子的糖优选地存在于该第二水相中的量大于或等于80重量%。

[0068] 酸水解或酶水解之后获得的糖类的量可通过本领域已知的技术测定,该技术为诸如,例如,高效液相色谱法(HPLC)或离子交换色谱法,关于糖类的量的测定的更多细节可在以下提供的示例中找到。

[0069] 根据本发明的一个优选实施例,该发酵可在20℃至40℃、优选地25℃至35℃的温度下进行。

[0070] 根据本发明的一个优选实施例,该发酵进行的时间可为2天至10天、优选地3天至8天。

[0071] 根据本发明的一个优选实施例,该发酵可在4.5至7、优选地5至6.7的PH下进行。为了将PH保持在所需范围内,可向用于发酵的培养基中加入用于获得所需PH的量的至少一种无机碱的水溶液,该无机碱为诸如,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化镁、或其混合物。

[0072] 根据本发明的一个优选实施例,该含油酵母可选自:粘红酵母、正红酵母(*Rhodotorula gracilis*)、禾本红酵母(*Rhodotorula graminis*)、斯达氏油脂酵母(*Lypomices starkeyi*)、产油油脂酵母(*Lypomices lipofer*)、变异三角酵母(*Trigonopsis variabilis*)、乳酒假丝酵母(*Candida kefir*)、弯假丝酵母(*Candida curvata*)、解脂假丝酵母(*Candida lipolytica*)、球拟酵母(*Torulopsis sp.*)、树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)。

[0073] 根据本发明的一个优选实施例,该发酵为进料-分批式发酵或连续式发酵,优选为连续式发酵。在连续式发酵的情况下,有含有至少一种多糖的生物质的再循环。

[0074] 在用于该发酵之前,该含油酵母优选地在包含木糖、纤维二糖、葡萄糖或其混合物的培养基中以优选地相对于培养基的总重量的1重量%至2重量%的浓度生长。

[0075] 该发酵可有利地在本领域已知的发酵罐中在通常用于该目的、包括各种营养素(诸如,例如氮、磷酸钾、镁、盐类、维生素类)的培养基的存在下进行。

[0076] 为了获得含油细胞生物质的更大的生产量,该第一水相或该第三水相可以在两个阶段进料至该发酵装置。

[0077] 根据本发明的一个优选实施例,该方法可包括:将一部分该第一水相或第三水相进料至该发酵装置,在以上指出的温度、压力和PH下操作;将剩余部分的该第一水相或第三水相以渐增的进料速率进料,在以上指出的温度、压力和PH下操作。应当指出的是,该进料

速率取决于发酵装置的尺寸：例如，在20升的发酵装置的情况下，该进料速率可为0.5l/h（起始进料速率）至5l/h（最终进料速率）、优选地0.8l/h（起始进料速率）至3.5l/h（最终进料速率）。

[0078] 根据本发明的一个优选实施例，可将该第二水相或第四水相以渐增的进料速率进料至发酵装置，在以上指出的温度、压力和PH下操作。应当指出的是，该进料速率取决于发酵装置的尺寸：例如，在20升的进料装置的情况下，该渐增的进料速率可为0.1l/h（起始进料速率）至0.4l/h（最终进料速率）、优选地0.15l/h（起始进料速率）至0.35l/h（最终进料速率）。

[0079] 根据本发明的一个优选实施例，该微孔过滤可通过基于可再生纤维素的膜（例如，Sartorius的以“Hydrosart[®] Microfiltration Cassettes”的商业名称已知的膜），或陶瓷膜（例如，Tami的以“Ceram inside[®]”的商业名称已知的膜）。

[0080] 如以上指出的，将该第二水相或第四水相进料至该发酵装置之后，该第二发酵液的至少一部分的微孔过滤允许发酵装置中该第二发酵液的体积保持恒定且允许增加该第二发酵液中的该第二含油细胞生物质浓度，因此相对于通常使用的量，允许更低量的含有至少一种多糖的生物物质和/或第一固相经过水解。

[0081] 应当指出的是，该微孔过滤将间隔地且以取决于各种参数的过滤速率进行，该参数为诸如，例如，发酵装置的尺寸、向该发酵装置进料该第二水相或第四水相的进料速率、含油细胞生物质的生长速率。例如，在20升的发酵装置的情况下，对于每个24小时的周期，该微孔过滤每30秒至5小时、优选地每40秒至4小时进行1分钟至10分钟、优选地2分钟至8分钟的持续时间，以50ml/min至200ml/min、优选地100ml/min至180ml/min的过滤速率进行。

[0082] 为了本发明的说明书和以下权利要求的目的，术语“渗余物”是指第二浓缩含油细胞生物物质。

[0083] 为了本发明的说明书和以下权利要求的目的，术语“渗透物”是指耗尽的培养基。

[0084] 应当指出的是，渗余物以与将该第二水相或该第四水相进料至该发酵装置相同的进料速率进料至发酵装置。

[0085] 为了增加脂类产率，可将玉米浆加入该发酵装置。

[0086] 根据本发明的一个优选实施例，该方法另外包括将量为2g/l至20g/l、优选地4g/l至18g/l的玉米浆加入该发酵装置。该玉米浆可在进料该第二水相之前、或在进料该第四水相之前加入。

[0087] 为了回收脂类，该第二含油细胞生物物质可经过热处理。

[0088] 根据本发明的一个优选实施例，该方法还包括将该包括脂类的第二含油细胞生物物质经过热处理。

[0089] 该热处理可使用本领域已知的设备和技术进行。例如，该热处理可使用加压高压釜（例如Brignole高压釜，Mod.AU-2）有利地进行。

[0090] 根据本发明的一个优选实施例，该热处理可在2巴至6.5巴、优选地3巴至5.5巴的压力下进行。

[0091] 根据本发明的一个优选实施例，该热处理可在100℃至160℃、优选地110℃至150℃的温度下进行。

[0092] 根据本发明的一个优选实施例，该热处理进行的时间可为1小时至8小时，优选地2

小时至5小时。

[0093] 在该热处理结束时,第二含油细胞生物质可通过使用例如回流提取器的提取来回收。

[0094] 根据本发明的一个优选实施例,该提取可在至少一种有机溶剂、优选地乙酸乙酯的存在下进行。

[0095] 根据本发明的一个优选实施例,该提取可在20℃至60℃、优选地30℃至50℃的温度下进行。

[0096] 根据本发明的一个优选实施例,该提取可在量为从该热处理获得的含油细胞生物质的量的2倍至6倍、优选地3倍至5倍的溶剂的存在下进行。

[0097] 该热处理之后获得的含油细胞生物质可经过一次或多次提取。该含油细胞生物质优选地经过一次至5次、优选地一次至3次提取。

[0098] 为了进一步浓缩该包括脂类的第二含油细胞生物质,在经过热处理之前该第二含油细胞生物质可经过离心。该离心可以以3,000rpm至9,000rpm、优选地4,000至8,000rpm的旋转速率、进行5分钟至30分钟、优选地15分钟至25分钟的时间。

[0099] 在以上提取结束时,获得以下两个相:

[0100] (i) 包括脂类的溶剂相;

[0101] (ii) 包括细胞碎片和痕量未被分离的脂类的湿固相。

[0102] 为了回收这些脂类,该溶剂相(i)经过蒸发,获得包括脂类的固相。

[0103] 本发明的目的的方法允许以40%至98%、优选地45%至95%的产率回收脂类,该产率是相对于发酵之后获得的含油细胞生物质(干)中存在的脂类的总量计算的。

[0104] 该溶剂相(i)中包含的脂类优选地为甘油三酯类、更优选地为甘油与相对于脂类的总重量量高于或等于80重量%、优选地高于或等于90重量%的、具有14至20个碳原子的脂肪酸类(诸如,例如,棕榈酸、硬脂酸、油酸、 α -亚油酸)的酯类。在该油相中可存在的其他脂类为:磷脂类、甘油单酯类、甘油二酯类、或其混合物。

[0105] 发酵之后获得的含油细胞生物质中包含的脂类的量,也即是该油相中包含的脂类的量,可通过本领域已知的技术测定,该技术为例如基于脂类与磷酸和磷酸-香草醛的反应的比色法:关于这个方法的另外的细节可在例如以下的文章中找到:“Chemical Basis of the Sulpho-phospho-vanillin Reaction for Estimating Total Serum Lipids”, J.A.Knight等,发表于“Clinical Chemistry”(1972),第18卷,第3期,第199至202页。

[0106] 该包括细胞碎片(特别是使用的含油酵母的细胞膜中包含的蛋白质类和多糖类)的湿固相(ii),可回收且在本发明的目的的方法中使用,特别地该湿固相(ii)可送至酸水解。然后膜的蛋白质类和多糖类水解为氨基酸类和单糖类(例如,葡萄糖、甘露糖),然后氨基酸类和单糖类用作随后发酵中的氮和碳源。应当指出的是,该湿固相(ii)的回收和使用允许将氮供给至用于发酵的培养基,且因此允许减少通常向发酵发生于其中的培养基中加入的氮的量,且允许提供用于发酵的另外的糖类。

[0107] 根据本发明的一个优选实施例,该方法还包括将该湿固相(ii)送至酸水解。在这种情况下,该第一水相、或该第二水相,除了该具有5至6个碳原子的至少一种糖和至少一种有机酸或该至少一种酶之外,还包括从膜的蛋白质类和多糖类的酸水解获得的氨基酸类和单糖类(例如,葡萄糖、甘露糖);而该第一固相或该第二固相除纤维素和/或木质素外,还包

括未水解的细胞碎片。

[0108] 为了获得更高的脂类的产率(例如产率高于98%),该湿固相(ii)可经过用溶剂的提取,或用醇/溶剂混合物的提取。

[0109] 根据本发明的一个优选实施例,该方法还包括将该水相(ii)经过用至少一种溶剂的提取,该溶剂可选自具有3至10个碳原子的脂肪烃类,诸如,例如,戊烷、正己烷、辛烷、或其混合物;或者用包括具有3至5个碳原子的至少一种脂肪醇与选自以上描述的具有3至10个碳原子的至少一种脂肪烃的混合物的提取,该脂肪醇可选自,例如,选自异丙醇、正丁醇、或其混合物。随后蒸发该有机溶剂和/或该混合物,获得包括脂类的另一油相和包括细胞碎片的另一湿固相。

[0110] 如以上对于湿固相(ii)所描述的,该提取之后获得的另一湿固相还可回收且送至酸水解。

[0111] 根据本发明的方法获得的脂类可经过在具有1至4个碳原子的至少一种醇(优选地甲醇、乙醇)和至少一种酸或碱催化剂的存在下的酯化,以制备甘油和烷基酯类,特别是甲酯类或乙酯类(生物柴油)。

[0112] 可选地,该脂类可经过在氢气和至少一种催化剂的存在下的氢化/脱氧以制备绿色柴油。氢化/脱氧方法在本领域是已知的且例如描述于欧洲专利申请EP 1,728,844中。

附图说明

[0113] 图1示出了本发明的目的的方法的第一实施例。

[0114] 图2示出了本发明的目的的方法的第二实施例。

具体实施方式

[0115] 现在通过以下提供的、参考附图1-2的两个实施例更详细地说明本发明。

[0116] 图1示出了本发明的目的的方法的第一实施例。为了这个目的,含有至少一种多糖的生物物质(例如,预研磨的木质纤维素生物物质)在无机酸的水溶液(例如,0.5%的硫酸的水溶液)的存在下经过酸水解,获得包括第一水相和第一固相的第一混合物,第一水相包含从半纤维素的水解获得的木糖和该无机酸,第一固相包括木质素和纤维素。

[0117] 该混合物经过过滤(图1中未示出),获得第一固相和第一水相。

[0118] 该第一水相在中和(例如,通过加入氢氧化钙)和随后的过滤(图1中未示出)之后,在含油酵母(例如禾本红酵母)的存在下被进料至发酵装置,获得包括第一含油细胞生物物质的第一发酵液(图1中未示出)。

[0119] 该第一固相经过水解(例如,在无机酸的水溶液、或酶的水溶液的存在下),获得包括第二水相和第二固相的第二混合物,第二水相包含从纤维素的水解获得的葡萄糖和该无机酸或该酶,第二固相含有木质素。

[0120] 该混合物经过过滤(图1中未示出),获得第二固相和第二水相。

[0121] 该第二水相在中和(例如,通过加入氢氧化钙)和随后的过滤(图1中未示出)之后,在包括第一含油细胞生物物质的第一发酵液的存在下被进料至发酵装置,获得包括含有脂类的第二含油细胞生物物质的第二发酵液(图1中未示出)。该第二发酵液的一部分经过微孔过滤(例如,通过对于每个24小时的周期每小时都被启动4分钟的蠕动泵取样,以150ml/min的

过滤速率操作),获得进料至该发酵装置的渗余物(即第二浓缩含油细胞生物质)和被除去的渗透物(即耗尽的培养基)。

[0122] 图2示出了本发明的目的的方法的第二实施例。为了这个目的,含有至少一种多糖的生物质(例如,预研磨的木质纤维素生物质)在无机酸的水溶液(例如,0.5%的硫酸的水溶液)的存在下经过酸水解,获得包括第一水相和第一固相的第一混合物,第一水相包含从半纤维素的水解获得的木糖和该无机酸,第一固相包括木质素和纤维素。

[0123] 该混合物经过过滤(图2中未示出),获得第一固相和第一水相。

[0124] 该第一水相在中和(例如,通过加入氢氧化钙)和随后的过滤(图2中未示出)之后,经过用至少一种吸附材料(例如,沸石CBV28014-Zeolyst)的处理,获得第三水相。

[0125] 该第三水相在含油酵母(例如禾本红酵母)的存在下被进料至发酵装置,获得包括第一含油细胞生物质的第一发酵液(图2中未示出)。

[0126] 该第一固相经过水解(例如,在无机酸的水溶液、或酶的水溶液的存在下),获得包括第二水相和第二固相的第二混合物,第二水相包含从纤维素的水解获得的葡萄糖和该无机酸或该酶,第二固相含有木质素。

[0127] 该混合物经过过滤(图2中未示出),获得第二固相和第二水相。

[0128] 该第二水相在中和(例如,通过加入氢氧化钙)和随后的过滤(图2中未示出)之后,经过用至少一种吸附材料(例如,沸石CBV28014-Zeolyst)的处理,获得第四水相。

[0129] 在该包括第一含油细胞生物质的第一发酵液的存在下将该第四水相进料至以上的发酵装置,获得包括含有脂类的第二含油细胞生物质的第二发酵液(图2中未示出)。该第二发酵液的一部分经过微孔过滤(例如,通过对于每个24小时的周期每小时都被启动4分钟的蠕动泵取样,以150ml/min的过滤速率操作),获得进料至该发酵装置的渗余物(即第二浓缩含油细胞生物质)和被除去的渗透物(即耗尽的培养基)。

[0130] 为了更好地理解本发明及其实施例,提供一些说明性的和非限制性的示例。

[0131] 示例1

[0132] 酸水解

[0133] 将4kg白杨木锯屑(粒径<1mm)加入22.8升的0.5%的硫酸的水溶液中。

[0134] 起始木质纤维素生物质的组分为以下的:相对于起始的木质纤维素生物质的总重量,50重量%的纤维素、25重量%的半纤维素、25重量%的木质素。

[0135] 将这样获得的反应混合物在反应器中在180℃下保持搅拌10分钟,获得包括第一固相(含有纤维素和木质素)和第一水相(含有糖类和硫酸)的第一混合物。

[0136] 从反应器中排出第一反应混合物和使第一反应混合物经过过滤,且获得以下产物:2.7kg(干重)的第一固相(含有纤维素和木质素)和22升第一水相(包括51g/l糖类和硫酸,在该糖类中有33g/l从半纤维素的酸水解获得的木糖和9g/l从纤维素的酸水解获得的葡萄糖)。

[0137] 该第一水相在搅拌反应器中通过加入氢氧化钙经过中和,直到达到等于6.5的PH,随后经过过滤,以除去已经形成的盐(即硫酸钙)。然后在搅拌反应器中将1.1kg Zeolyst International的沸石CBV28014(MFI型,Si/Al比=140)加入该第一水相。获得的悬浮液在25℃下、在大气压(1巴)下被搅拌4小时,且随后被过滤以分离沸石,获得22升的、糠醛和羟甲基糠醛的含量低于0.1g/l且糖类的含量等于46.41g/l(其中有30g/l的木糖和8.3g/l的

葡萄糖)的第三水相。

[0138] 糠醛和羟甲基糠醛的含量通过高效液相色谱法 (HPLC) 使用Agilent的Zorbax Bonus RP柱(100mm x 2.1mm、3.5 μ m)测定,流动相(movable phase)为在0.2%甲酸的水溶液中的0.01mM的醋酸。

[0139] 糖含量通过离子交换色谱法 (HPAE-PAD) 使用装有Carbopac PA100柱的Dionex色谱仪测定,梯度氢氧化钠和醋酸钠作为平衡离子。

[0140] 将18.4升的0.5%的硫酸的水溶液加入以上2.7kg的该第一固相。

[0141] 这样获得的反应混合物在反应器中、在230℃下、保持搅拌1分钟,获得包括第二固相(包括木质素)和第二水相(包括糖类和硫酸)的第二混合物。

[0142] 将第二反应混合物从反应器中排出和经过过滤,且获得以下的产物:1.2kg(干重)的第二固相(包括木质素)和18升的第二水相(包括53g/l的糖类和硫酸,糖类中有52g/l的从纤维素的酸水解获得的葡萄糖)。

[0143] 该第二水相在搅拌反应器中、通过加入氢氧化钙经过中和,直到达到等于6.5的PH,且随后经过过滤,以除去已经形成的盐(即硫酸钙)。然后在搅拌反应器中将1.1kg的Zeolyst International的沸石CBV28014(MFI型,Si/Al比=140)加入该第一水相。将获得的悬浮液在25℃下、在大气压(1巴)下搅拌4小时,且随后过滤以分离沸石,获得18升的、糠醛和羟甲基糠醛的含量低于0.1g/l(如上所述地测量该含量)且糖类的含量等于48.23g/l(其中有47g/l的葡萄糖和痕量的其他糖类)(如上所述地测量该含量)的第四水相。

[0144] 发酵

[0145] 发酵在20升的发酵罐中进行。

[0146] 为了这个目的,在0.5升烧瓶中,持续一夜,搅拌下(170rpm),在30℃下,在YEPG培养基中生长用于包含2重量%的葡萄糖的酵母的禾本红酵母DBVPG 4620菌株,达到等于0.1g/l(干重)的浓度。该培养物作为接种物。

[0147] 将如上所述地获得的接种物与8升的如上所述地获得的第三水相一起进料至以上的发酵罐。

[0148] 搅拌下、以500rpm、在30℃下、每升培养物无菌空气的换气为1l/min、在等于5.5的pH下、持续36小时生长禾本红酵母DBVPG 4620的细胞,获得124g的第一含油细胞生物质(浓度等于15g/l-干重)。

[0149] 然后将剩余的14升第三水相以0.9l/h(起始进料速率)至2.5l/h(最终进料速率)的渐增的进料速率进料(进料分批式进料)至含有包括第一含油细胞生物质的第一发酵液的发酵罐,在以上指出的相同操作条件下,44小时之后,获得等于20升的培养物体积。最后,获得413g第一含油细胞生物质[浓度等于20.2g/l(干重)]。

[0150] 将发酵液的体积恒定地保持在20升,以0.9l/h(起始进料速率)至0.31l/h(最终进料速率)的渐增的进料速率,将如上所述地获得的18升的第四水相连续地进料至该发酵罐。将整个混合物以500rpm、在30℃下、每升培养物无菌气体的换气为1l/min、在等于5.5的pH下,保持搅拌76小时。

[0151] 将装有Sartorius的微孔过滤膜“Hydrosart[®] Microfiltration Cassettes”的微孔过滤装置通过蠕动泵连接至发酵罐,以除去耗尽的培养基(渗透物)和浓缩第二发酵液中制备的第二含油细胞生物质(渗余物)。为了这个目的,对于每个24小时的周期,该蠕动泵每

小时被启动4分钟,除去一部分包括该第二含油细胞生物质的第二发酵液,以等于150ml/min的过滤速率操作。将该第二含油细胞生物质这样浓缩5次,获得以等于0.31l/h的进料速率进料至发酵罐的渗余物(即第二浓缩含油细胞生物质)和被除去的渗透物(即被耗尽的培养基)。

[0152] 发酵结束时,收集酵母细胞且以7,000rpm离心酵母细胞20分钟,获得1,500g的该第二含油细胞生物质[760g(干重)-浓度等于38g/l(干重)]。

[0153] 脂类的回收

[0154] 脂类的回收在2升的Brignole高压釜Mod.AU-2中进行。

[0155] 为了这个目的,将1,500g[760g(干重)]的如上所述地获得的含油细胞生物质进料至以上高压釜,在4.9巴的压力且在等于140℃的温度下保持4小时。

[0156] 在以上条件下4小时之后,将1,410g[714g(干重)]的含油细胞生物质从高压釜中排出。该含油细胞生物质在装有恒温器的回流提取器中、在等于45℃的温度下、在乙酸乙酯(乙酸乙酯的体积等于该含油细胞生物质的重量的4倍)的存在下经过两个提取周期,每个周期为2小时,获得(i)包括脂类的溶剂相和(ii)包括细胞碎片和痕量未被分离的脂类的湿固相。

[0157] 通过过滤分离该溶剂相(i)和该湿固相(ii)。

[0158] 该溶剂相(i)经过脂含量的测定。获得的脂类的总含量证明为等于342g[回收产率等于92%(相对于发酵之后获得的第二含油细胞生物质(干)中存在的脂类的总量计算)]。

[0159] 脂含量使用基于脂类与磷酸和磷酸-香草醛的反应的比色法测定。

[0160] 该湿固相(ii)证明为包括水和细胞碎片,细胞碎片包含42重量%(干重)的多糖类和45重量%(干重)的蛋白质类。

[0161] 多糖类的含量通过使用Fehling法的分光光度计测量读取而测定,蛋白质含量通过Bradford法测定。

[0162] 示例2

[0163] 酸水解

[0164] 将4kg白杨木锯屑(粒径<1mm)加入22.8升的0.5%的硫酸的水溶液中。

[0165] 起始木质纤维素生物质的组分为以下的:相对于起始的木质纤维素生物质的总重量,50重量%的纤维素、25重量%的半纤维素、25重量%的木质素。

[0166] 将这样获得的反应混合物在反应器中、在180℃下、保持搅拌10分钟,获得包括第一固相(含有纤维素和木质素)和第一水相(含有糖类和硫酸)的第一混合物。

[0167] 从反应器中排出第一反应混合物和使第一反应混合物经过过滤,且获得以下产物:2.7kg(干重)的第一固相(含有纤维素和木质素)和22升第一水相(包括51g/l糖类和硫酸,在该糖类中有33g/l从半纤维素的酸水解获得的木糖和9g/l从纤维素的酸水解获得的葡萄糖)。

[0168] 该第一水相在搅拌反应器中、通过加入氢氧化钙经过中和,直到达到等于6.5的PH,随后经过过滤,以除去已经形成的盐(即硫酸钙)。然后在搅拌反应器中将1.1kg Zeolyst International的沸石CBV28014(MFI型,Si/Al比=140)加入该第一水相。获得的悬浮液在25℃下、在大气压(1巴)下被搅拌4小时,且随后被过滤以分离沸石,获得22升的、糠醛和羟甲基糠醛的含量低于0.1g/l且糖类的含量等于46.41g/l(其中有30g/l的木糖和

8.3g/1的葡萄糖)的第三水相。

[0169] 糠醛和羟甲基糠醛的含量通过高效液相色谱法 (HPLC) 使用Agilent的Zorbax Bonus RP柱(100mm x 2.1mm、3.5 μ m)测定,流动相为在0.2%甲酸的水溶液中的0.01mM的醋酸。

[0170] 糖含量通过离子交换色谱法 (HPAE-PAD) 使用装有Carbopac PA100柱的Dionex色谱仪测定,梯度氢氧化钠和醋酸钠作为平衡离子。

[0171] 将18.4升的0.5%的硫酸的水溶液加入以上2.7kg的该第一固相。

[0172] 这样获得的反应混合物在反应器中、在230℃下、保持搅拌1分钟,获得包括第二固相(包括木质素)和第二水相(包括糖类和硫酸)的第二混合物。

[0173] 将第二反应混合物从反应器中排出和经过过滤,且获得以下的产物:1.2kg(干重)的第二固相(包括木质素)和18升的第二水相(包括53g/1的糖类和硫酸,糖类中有52g/1的从纤维素的酸水解获得的葡萄糖)。

[0174] 该第二水相在搅拌反应器中、通过加入氢氧化钙经过中和,直到达到等于6.5的PH,且随后经过过滤,以除去已经形成的盐(即硫酸钙)。然后在搅拌反应器中将1.1kg Zeolyst International的沸石CBV28014(MFI型,Si/Al比=140)加入该第一水相。将获得的悬浮液在25℃下、在大气压(1巴)下、搅拌4小时,且随后过滤以分离沸石,获得18升的、糠醛和羟甲基糠醛的含量低于0.1g/1(如上所述地测量该含量)且糖类的含量等于48.23g/1(其中有47g/1的葡萄糖和痕量的其他糖类)(如上所述地测量该含量)的第四水相。

[0175] 发酵

[0176] 发酵在20升的发酵罐中进行。

[0177] 为了这个目的,在0.5升烧瓶中,持续一夜,搅拌下(170rpm),在30℃下,在YEPG培养基中生长用于包含2重量%的葡萄糖的酵母的禾本红酵母DBVPG 4620菌株,达到等于0.1g/1(干重)的浓度。该培养物作为接种物。

[0178] 将15g/1玉米浆加入该22升如上所述地获得的第三水相。

[0179] 将如上所述地获得的接种物与8升包含玉米浆的该第三水相一起进料至以上的发酵罐。

[0180] 搅拌下、以500rpm、在30℃下、每升培养物无菌空气的换气为1l/min、在等于5.5的pH下、持续36小时生长禾本红酵母DBVPG 4620的细胞,获得124g的第一含油细胞生物质(浓度等于15g/1-干重)。

[0181] 然后将剩余的14升包含玉米浆的该第三水相以0.9l/h(起始进料速率)至2.5l/h(最终进料速率)的渐增的进料速率进料(进料分批式进料)至含有包括第一含油细胞生物质的第一发酵液的该发酵罐,在以上指出的相同操作条件下,44小时之后,获得等于20升的培养物体积。最后,获得429g第一含油细胞生物质[浓度等于23.55g/1(干重)]。

[0182] 将发酵液的体积恒定地保持在20升,以0.19l/h(起始进料速率)至0.31l/h(最终进料速率)的渐增的进料速率,将如上所述地获得的18升第四水相连续地进料至该发酵罐。将整个混合物以500rpm、在30℃下、每升培养物无菌气体的换气为1l/min、在等于5.5的pH下,保持搅拌76小时。

[0183] 将装有Sartorius的微孔过滤膜“Hydrosart[®] Microfiltration Cassettes”的微孔过滤装置通过蠕动泵连接至发酵罐,以除去耗尽的培养基(渗透物)和浓缩第二发酵液中

制备的第二含油细胞生物质(渗余物)。为了这个目的,对于每个24小时的周期,该蠕动泵每小时被启动4分钟,除去一部分包括该第二含油细胞生物质的第二发酵液,以等于150ml/min的过滤速率操作。将该第二含油细胞生物质这样浓缩5次,获得以等于0.311/h的进料速率进料至发酵罐的渗余物(即第二浓缩含油细胞生物质)和被除去的渗透物(即被耗尽的培养基)。

[0184] 发酵结束时,收集酵母细胞且以7,000rpm离心酵母细胞20分钟,获得1,560g的该第二含油细胞生物质[790g(干重)-浓度等于39.5g/l(干重)]。

[0185] 脂类的回收

[0186] 脂类的回收在2升的Brignole高压釜Mod.AU-2中进行。

[0187] 为了这个目的,将1,560g[760g(干重)]的如上所述地获得的含油细胞生物质进料至以上高压釜,在4.9巴的压力下且在等于140℃的温度下保持4小时。

[0188] 在以上条件下4小时之后,将1,466g[742g(干重)]的含油细胞生物质从高压釜中排出。该含油细胞生物质在装有恒温器的回流提取器中、在等于45℃的温度下、在乙酸乙酯(乙酸乙酯的体积等于该含油细胞生物质的重量的4倍)的存在下经过两个提取周期,每个周期为2小时,获得(i)包括脂类的溶剂相和(ii)包括细胞碎片和痕量的未被分离的脂类的湿固相。

[0189] 通过过滤分离该溶剂相(i)和该湿固相(ii)。

[0190] 该溶剂相(i)经过脂含量的测定。获得的脂类的总含量证明为等于418g[回收产率等于94%(相对于发酵之后获得的第二含油细胞生物质(干)中存在的脂类的总量计算)]。

[0191] 脂含量使用基于脂类与磷酸和磷酸-香草醛的反应的比色法测定。

[0192] 该湿固相(ii)证明为包括水和细胞碎片,细胞碎片含有42重量%(干重)的多糖类和45重量%(干重)的蛋白质类。

[0193] 多糖类的含量通过使用Fehling法的分光光度计测量读取而测定,蛋白质含量通过Bradford法测定。

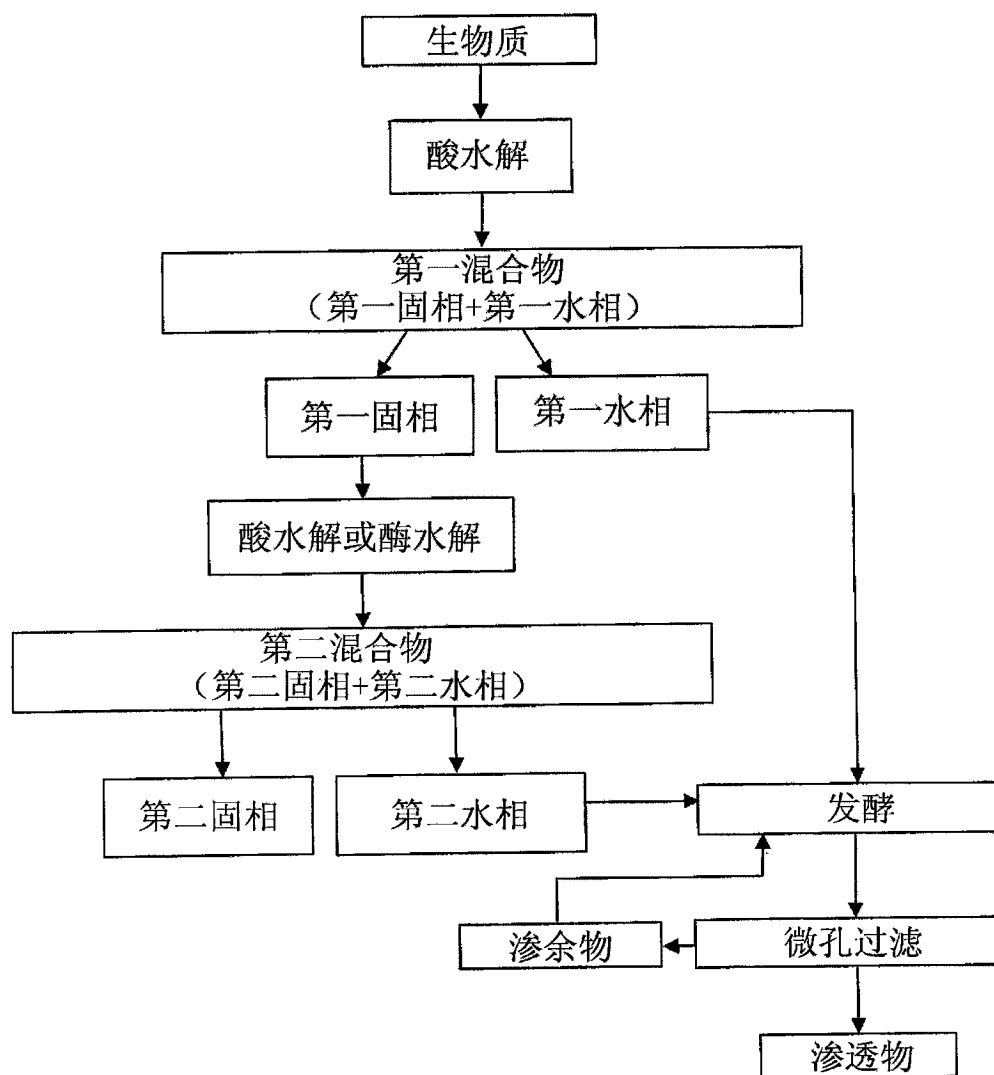


图1

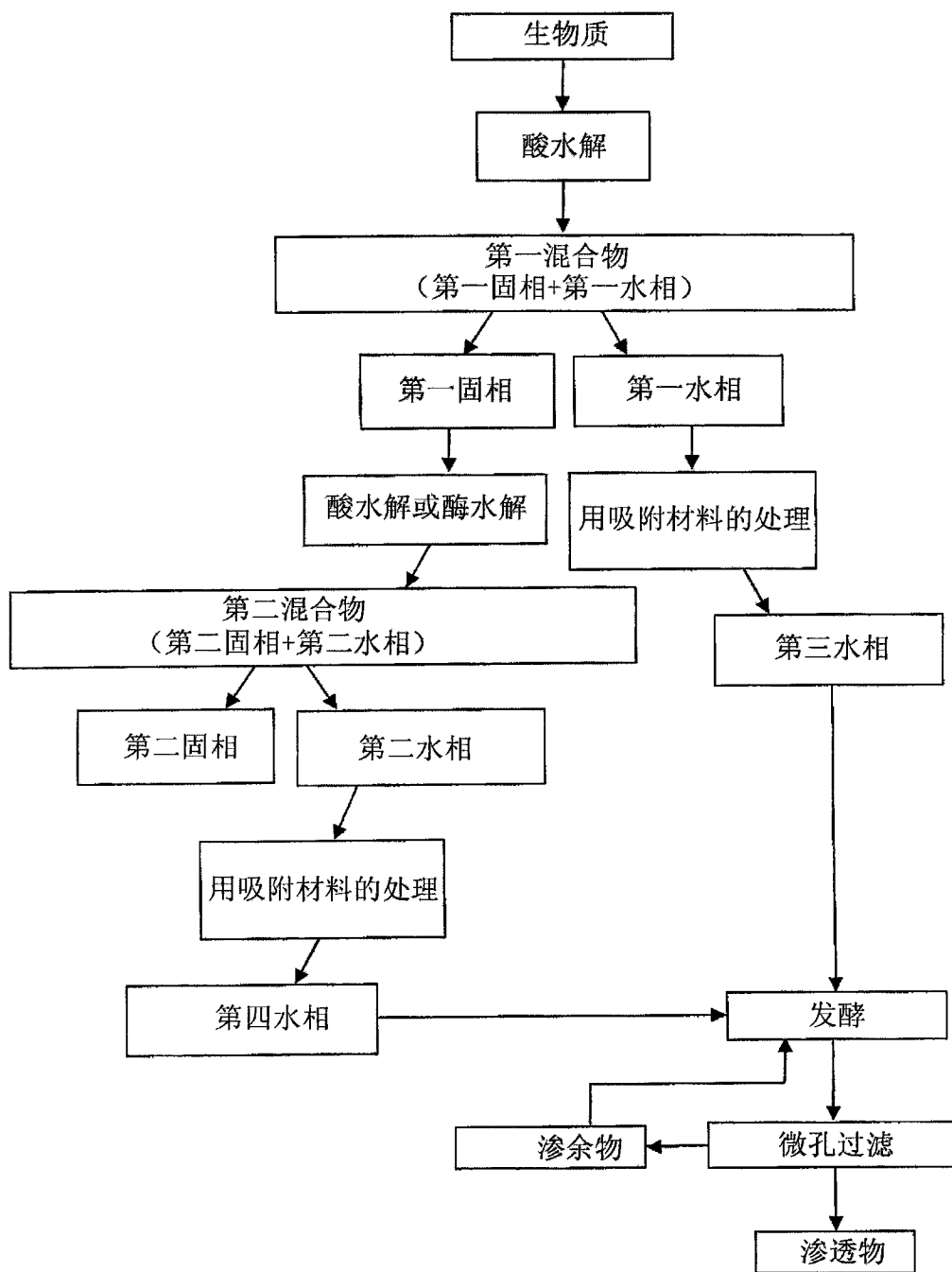


图2