



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104245946 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201380021010. 7

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(22) 申请日 2013. 04. 10

代理人 牟静芳 高瑜

(30) 优先权数据

61/638, 544 2012. 04. 26 US

PCT/US2012/056593 2012. 09. 21 US

(51) Int. Cl.

C12P 7/14(2006. 01)

C12P 19/00(2006. 01)

C08B 37/14(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 10. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/035879 2013. 04. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/162881 EN 2013. 10. 31

(71) 申请人 阿彻丹尼尔斯米德兰德公司

地址 美国伊利诺斯州

(72) 发明人 T·P·宾德

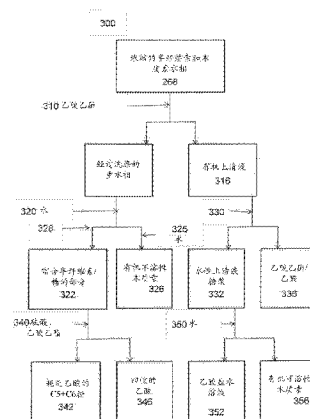
权利要求书2页 说明书31页 附图10页

(54) 发明名称

用于制造糖浆和木质素部分的木质纤维素生物物质的液体 / 液体分离

(57) 摘要

本发明描述了一种用于由木质纤维素生物物质和由其获得的发酵产物制造富含 C5 和 C6 糖的糖浆的方法。木质纤维素生物物质用乙酸处理并且用 C₁-C₉酸可混溶的有机溶剂（例如乙酸乙酯）对它进行洗涤。与一种富含纤维素纸浆的部分分离地获得一种富含可溶半纤维素和木质素的部分，并且将木质素从该可溶半纤维素部分移除。该富含可溶半纤维素和木质素的部分经历液体 / 液体分离，以获得富含 C5 糖和 C6 糖的水相并且降低乙酸含量。该糖浆适用于发酵。该方法还制造有机不溶性木质素、有机可溶性木质素以及乙酸盐的部分。



1. 一种加工木质纤维素生物质的方法,包括:
 - a. 使一种木质纤维素生物质与一个第一量的乙酸接触;
 - b. 将该经过接触的木质纤维生物质加热到一个温度并且持续一段时间,该温度和该时间足够水解释放半纤维素和木质素的一个第一部分,形成一种水解产物液体和一种酰化的木质纤维素饼;
 - c. 将该酰化的木质纤维素饼与该第一水解产物液体分离;
 - d. 使该酰化的木质纤维素饼与一个第二量的该乙酸接触以将半纤维素和木质素从该酰化的木质纤维素饼洗涤,并且将一个酸洗涤液体与该经过酸洗涤的酰化的木质纤维素饼分离;
 - e. 使该经过酸洗涤的酰化的木质纤维素饼与一个第一量的一种 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂接触以从该经过酸洗涤的酰化的木质纤维素饼洗涤该乙酸、半纤维素以及木质素,并且回收与该经过溶剂洗涤的酰化的木质纤维素饼分开的该 C_1-C_2 酸可混溶的溶剂洗涤液体;
 - f. 将该溶剂洗涤液体与该水解产物和该酸洗涤液体中的至少一者合并,形成一种酸性有机溶剂萃取物;
 - g. 使该酸性有机溶剂萃取物缩合以形成一种富含半纤维素和木质素的浓缩的半纤维素和木质素水相;以及,
 - h. 向该浓缩的半纤维素和木质素水相中添加一个第二量的该 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂,足够引起相分隔成一个包含一个富含 C5 和 C6 糖和有机不溶性木质素的经过洗涤的重水相的第一相和一个包含一个有机上清液相的第二相,该有机上清液相包含有机可溶性木质素、乙酸盐、 C_1-C_2 酸可混溶的溶剂以及乙酸。
2. 如权利要求 1 所述的方法,进一步包括
 - a. 使该经过洗涤的重水相与一个足以引起沉淀的量的水接触;
 - b. 在一个温度下加热该与水接触的经洗涤的重水相并且持续一段时间,足够引起凝结,形成凝结的有机不溶性木质素和一种富含 C5 和 C6 糖的富含半纤维素 / 糖的部分;并且,
 - c. 回收与该富含半纤维素 / 糖的部分分开的该有机不溶性木质素。
3. 如权利要求 2 所述的方法,进一步包括
 - a. 使该富含半纤维素 / 糖的部分与至少一种酸接触以形成一种酸化的富含半纤维素 / 糖的部分;并且,
 - b. 使该酸化的富含半纤维素 / 糖的部分与一个量的一种 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂接触,足够从该 C5 和 C6 糖糖浆萃取乙酸并且引起相分隔成一个第三相,该第三相包含一种富含 C5 和 C6 糖的耗乏乙酸的 C5 和 C6 糖浆并且乙酸含量降低,和一个第四有机相,该第四有机相包含与该第三相相比 C5 和 C6 糖含量降低的回收的乙酸。
4. 如权利要求 1 所述的方法,进一步包括
 - a. 使该第二相经历蒸发以回收该 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂和与富含有机可溶性木质素的一种水性上清液糖浆分开的乙酸。
5. 如权利要求 4 所述的方法,进一步包括使该水性上清液糖浆与足够的水接触,以引起相分离和获得一个第五相,该第五相包含一种富含乙酸盐并且有机可溶性木质素含量降

低的水相,和一个第六相,该第六相包含一种富含有机可溶性木质素的相。

6. 如权利要求 4 或权利要求 5 所述的方法,其中该缩合是通过蒸发该乙酸和该 C1-C2 酸可混溶的有机溶剂来进行的。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其中通过蒸馏来分离和回收该乙酸和该 C1-C2 酸可混溶的有机物。

8. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法,进一步包括使一个富含 C5 和 C6 糖的相与一种微生物接触以产生一种所希望的发酵产物。

9. 如权利要求 1 到 8 中任一项所述的方法,其中该 C1-C2 酸可混溶的有机溶剂不是一种卤化有机溶剂。

10. 一种组合物,包括通过如权利要求 2 所述的方法获得的一种有机不溶性木质素。

11. 如权利要求 10 所述的包括有机不溶性木质素的组合物,其中该 C₁-C₂ 酸可混溶的有机溶剂是乙酸乙酯。

12. 一种通过如权利要求 2 或权利要求 11 所述的方法获得的组合物,其中该有机不溶性木质素包括来源于软木,如针叶树、云杉、雪松、松树以及红木的木质素;来源于硬木,如枫树、白杨、橡树、桉树以及椴木的木质素;来源于茎秆,如秸秆、玉米、芥花、燕麦、稻谷、高粱、小麦、大豆、大麦、斯佩耳特小麦 (spelt) 以及棉花的木质素;来源于禾本植物,如竹子、芒草、甘蔗、柳枝稷、草芦、大米草的木质素,以及其中任一种的组合。

13. 一种组合物,包括通过如权利要求 5 所述的方法获得的一种有机可溶性木质素。

14. 一种通过如权利要求 5 或权利要求 13 所述的方法获得的组合物,其中该有机不溶性木质素包括来源于软木,如针叶树、云杉、雪松、松树以及红木的木质素;来源于硬木,如枫树、白杨、橡树、桉树以及椴木的木质素;来源于茎秆,如秸秆、玉米、芥花、燕麦、稻谷、高粱、小麦、大豆、大麦、斯佩耳特小麦以及棉花的木质素;来源于禾本植物,如竹子、芒草、甘蔗、柳枝稷、草芦、大米草的木质素,以及其中任一种的组合。

15. 如权利要求 1 到 9 中任一项所述的方法,其中该木质纤维素生物质具有不超过 40% wt/wt 的水含量。

16. 如权利要求 1 到 9 中任一项所述的方法,其中该木质纤维素生物质具有不超过 20% wt/wt 的水含量。

17. 如权利要求 1 到 9 中任一项所述的方法,其中该木质纤维素生物质具有不超过 10% wt/wt 的水含量。

18. 一种包括从纤维素生物质获得的乙酸盐的组合物,其中这些乙酸盐适用于肥料。

用于制造糖浆和木质素部分的木质纤维素生物质的液体 / 液体分离

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求现在待决的 2012 年 9 月 21 日提交的专利合作条约申请号 PCT/US12/56593 的优先权, 该申请要求 2012 年 4 月 26 日提交的名称为 C1-C2 有机酸处理木质纤维素生物质以制造酰化纤维素纸浆、半纤维素、木质素以及糖和糖的发酵 (C1-C2 Organic Acid Treatment of Lignocellulosic Biomass to Produce Acylated Cellulose Pulp, Hemicellulose, Lignin and Sugars and Fermentation of the Sugars) 的临时申请 61/638, 544 的权利。以上标识的专利申请的全部内容通过引用结合在此以便提供披露的连续性。

联邦赞助研究声明

[0002] 本发明在政府支持下根据能源部授权号 :DE-EE0002870 进行。联邦政府拥有本发明的某些权利。

背景技术

[0003] 纤维素和半纤维素向单体糖的水解是将如以下各项的木质纤维素原料商业转化成单体糖的一种关键前提 :玉米秆、玉米纤维皮、大豆皮、麦秸、甘蔗渣、甜糖用甜菜废粕以及来源于由多年生禾草 (如柳枝稷或芒)、软和 / 或硬木组成的能源作物的其他植物生物质形式、以及纸浆和废纸残余物。

[0004] 许多纤维素水解集中于制造适用于纸浆与造纸工业应用的纸浆流而非回收可发酵的 C5 和 C6 糖。乙酸制浆方法 (Acetosolv process) 使用浓乙酸和氢氯酸进行制浆, 使木质素和半纤维素在温和条件下水解降解。在乙酸制浆方法中, 通过在含有超过 50% 乙酸的水混合物中, 在设定的时间和温度下蒸煮来脱除生物质 (如原木) 的木质素。在蒸煮之后, 从溶解的固体分离残余纸浆并且用乙酸 / 水进一步洗涤纸浆, 并且接着最终用水洗涤, 最终产生纸浆、不含硫的木质素以及富含糖和寡糖的部分, 但混杂有有机酸。

[0005] 然而, 木质纤维素生物质向单体糖的转化给这些单体糖尤其作为用于通过使这些糖发酵来制造如乙醇的产物的原料的经济用途造成许多技术挑战。那些挑战的解决方案呈现于现在待决的 2012 年 4 月 26 日提交的名称为 C1-C2 有机酸处理木质纤维素生物质以制造酰化纤维素纸浆、半纤维素、木质素以及糖和糖的发酵的美国临时申请 61/638, 544 和 2012 年 9 月 21 日提交的专利合作条约申请号 PCT/US12/56593 中。本披露是针对该披露的方法和组合物的改良。该披露的方法是使用过量的溶剂进行, 该过量的溶剂添加到浓缩的半纤维素和木质素水相中以使半纤维素和木质素沉淀, 接着过滤以回收半纤维素 / 木质素。这在此被称为过滤法。

[0006] 因此在本领域中仍然需要开发用于回收和纯化可发酵的 C5 和 C6 糖而无毒性副产物以及回收木质素部分, 同时降低所使用的水和溶剂的量的整合式和更加有成本效益的方法。

本发明的发明内容

[0007] 在此所述的方法和由此制造的物质克服了许多前述技术挑战。这些方法包括在初始回合的水解中使用温和乙酸结合适合的 C_1 - C_2 酸可混溶的有机溶剂, 以将酸可溶半纤维素和木质素与纤维素纸浆分离。使用乙酸引起半纤维素和纤维素酯化, 这通过在使用纤维素分解和半纤维素分解酶的适当混合物使这些部分进一步水解之前或结合该进一步水解进行酶促和 / 或化学去酯化来克服。优选实施例中包括酯酶。在该酶促水解中使用非离子清洁剂实质上增加了催化转化成适合的富集 C5 和 C6 的糖浆的速率。此外, 在分阶段发酵过程中使用其在发酵液中的乙醇产生。所得结果因为与公开的论文相反而出人意料, 纤维素水解成葡萄糖可以在不显著抑制纤维素酶活性的情况下进行, 并且乙醇浓度超过 5% 并未对所测试的共混物中的酶活性不利。这表明新的商业混合共混物几乎没有反馈抑制并且蛋白质的沉淀并不显著。以上内容可以基于新的商业共混物中的酶活性和共混产物中可能更大的纯度的更加平衡, 由此减少与其他非必需蛋白质的共同沉淀来解释。

[0008] 另一个方面包括用于纯化衍生自酸可溶半纤维素的糖的高效液体 / 液体分离方法, 该酸可溶半纤维素衍生自木质纤维素生物质。液体 / 液体分离方法使得能够分离富含 C5 和 C6 糖以及有机不溶性木质素的水相与富含有机可溶性木质素和乙酸盐的有机上清液相。通过水诱导的凝结、加热以及过滤从水相回收有机不溶性木质素和富含 C5 和 C6 糖的糖浆。富含 C5 和 C6 糖的糖浆的酸化允许通过将溶剂施加到富含 C5 和 C6 糖的糖浆中进行进一步液体 / 液体分离步骤。在这一方法中, 从富含 C5 和 C6 糖的糖浆移除乙酸以产生耗乏乙酸的富含 C5 和 C6 糖的 C5+C6 糖和回收的酸的溶液。在一个替代实施例中, 在水诱导的凝结和加热之后, 有机不溶性木质素与一个第二量的水接触并且过滤以产生有机不溶性木质素。在另外的实施例中, 富含有机可溶性木质素和乙酸盐的有机上清液相经历蒸发以回收 C_1 - C_2 酸可混溶的有机溶剂并且乙酸与富含有机可溶性木质素和乙酸盐的水性上清液糖浆分离。可以浓缩 C_1 - C_2 酸可混溶的有机溶剂和乙酸以回收溶剂和酸。在另外的实施例中, 水性上清液糖浆的液体 / 液体分离是通过使其与足够的水接触以引起相分离来进行的, 产生富含乙酸盐的水相和富含有机可溶性木质素的相。在又一个实施例中, 富含 C5 和 C6 糖的一个或多个过程流体可以与微生物接触以产生发酵产物。在一个替代实施例中, C_1 - C_2 酸可混溶的有机溶剂不是卤化溶剂。在又一个实施例中, 呈现通过在此呈现的方法获得的有机不溶性木质素。在另一个实施例中, 呈现通过在此呈现的方法获得的有机可溶性木质素。在所选择的实施例中, 有机不溶性木质素或有机可溶性木质素包含来源于软木 (如针叶树、云杉、雪松、松树以及红木) 的木质素; 来源于硬木 (如枫树、白杨、橡树、桉树以及椴木) 的木质素; 来源于茎秆 (如秸秆、玉米、芥花、燕麦、稻谷、高粱、小麦、大豆、大麦、斯佩耳特小麦 (spelt) 以及棉花) 的木质素; 来源于禾本植物 (如竹子、芒草、甘蔗、柳枝稷、草芦、大米草) 的木质素, 以及其中任一种的组合。在其他实施例中, 木质纤维素生物质的含水量不超过 40% wt/wt、不超过 20% wt/wt 或不超过 10% wt/wt。在又一个实施例中, 适用于肥料的乙酸盐是从纤维素生物质获得的。

附图说明

[0009] 图 1 是生物炼制的总体实施例的图解, 该生物炼制用于加工木质纤维素生物质以形成纤维素纸浆、半纤维素部分以及木质素部分, 并且随后通过发酵形成 C5 和 C6 糖以用于制造乙醇或其他产物。

[0010] 图 2 示出了将乙酸和 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂结合用于由木质纤维素生物质制备纤维素纸浆、半纤维素部分以及木质素部分的方法的实施例。

[0011] 图 3 是 FTIR 光谱图并且示出了玉米秆纤维素纸浆（上部迹线）和用氢氧化铵处理的玉米秆纸浆（下部迹线）的差异。

[0012] 图 4 是 FTIR 光谱图，证实在用氢氧化铵处理的玉米秆纸浆中不存在酯化乙酸。

[0013] 图 5 是展示通过纤维素酶处理从去乙酰化玉米秆释放的葡萄糖的量的图式。

[0014] 图 6 是这样一种图式：展示在添加表面活性剂的情况下，在 20% 固体纤维素纸浆 218 下水解的酶的酵母菌株 424a 的摇瓶发酵烧瓶的结果。

[0015] 图 7 是示出了用于从木质纤维素生物质制造乙醇的两阶段半同时水解和发酵方法的一种优化方法的图解。

[0016] 图 8 是这样一种图式：示出了在实验室摇瓶中一式两份进行的在通过酵母菌株 424a 的示例性第一阶段发酵期间制造乙醇和同时使用 C5 糖木糖的时程。EFT = 经过的发酵时间（小时）。

[0017] 图 9 是通过液体 / 液体分离来加工木质纤维素生物质的生物炼制的整体实施例的图解，该生物炼制实质上降低溶剂体积并且防止乳液形成，以通过发酵形成有机可溶性木质素部分、有机不溶性木质素部分以及 C5 和 C6 糖以用于制造乙醇或其他产物。

发明详细说明

[0018] “木质纤维素生物质”意指一种植物物质，其中大部分碳水化合物呈与淀粉和糖不同的纤维素和半纤维素形式。为了使本发明最大程度地可工作，木质纤维素生物质应该具有少于 40% 的一个水分含量，并且在典型实施例中，水分含量应该是少于 30%、优选少于 20% 并且最优选少于 10%。还优选的是使用具有相对低蛋白质含量的生物质，因为更高量的蛋白质干扰加工步骤并且污染最终回收的半纤维素和木质素部分。蛋白质含量应低于生物质的 10% wt/wt。在大部分实施例中优选低于 5%。适合的实例包括木材、禾本植物、谷类的茎秆（如小麦（秸秆）、玉米（秆）、大麦、粟以及稻谷）、以及来自收获双子叶作物的残余植物废料（包括豆类和谷物的一些皮）。具有过多蛋白质的不适合的木质纤维素生物质包括（例如）玉米皮（也称为来自湿磨玉米加工操作的“玉米纤维”流）。

[0019] 乙酸可以包括至多 30% 水。尽管在本披露中乙酸作为优选酸使用，但甲酸将也是适合的。

[0020] “ C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂”是与乙酸可混溶并且能够由含有半纤维素和木质素的乙酸溶液形成半纤维素和木质素的沉淀物的非酸性有机溶剂，其条件仅是该 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂不是卤化溶剂。所使用的有机溶剂具有以下特征：糖在溶剂中的可溶性必须较低，并且至少木质素的子部分必须在溶剂中部分可溶。这些溶剂略微具有极性。优选的是水在有机溶剂中的可溶性应较低。此外，溶剂的极性不应过低使得无法从水有效萃取乙酸。适合的实例包括低分子量醇、酮以及酯，如 C_1-C_4 醇、丙酮、乙酸乙酯、乙酸甲酯以及甲基乙基酮，以及四氢呋喃。

[0021] “酰化”和“酰化的”意指在多糖的糖或糖残基与有机酸之间形成酯键。

[0022] “液体 / 液体萃取”和“液体 / 液体分离”意指基于化合物在两种不同的不可混溶的液体中的相对可溶性来分离这些化合物的方法。

[0023] “分隔”意指化合物或化合物混合物在存在两种不可混溶的相的情况下的状态。化

合物或化合物的混合物在这种情况下称为分隔成既定相；当与两种不可混溶的相接触时，一个相中的化合物或化合物混合物的浓度大于另一个相中的化合物或化合物混合物的浓度。

[0024] 本披露对专利合作条约申请号 PCT/US12/56593 中描述的过滤方法的一项改良是增加可以进行的木质纤维素生物质的水解程度。由于使用使半纤维素和木质素两者沉淀的溶剂，同时从半纤维素萃取夹带的水，在过滤方法中，木质纤维素生物质水解中释放的单糖量必须相对较低。更程度的水解使溶剂难以使用并且昂贵，因为单糖对水的亲和力远高于寡糖对水的亲和力。因此，需要过高含量的溶剂、极性更高的溶剂或极高的剪力。

[0025] 本披露对过滤方法的另一项改良是本披露的方法需要更少溶剂。因此，用更高浓度的所希望的组分操作过程流。因为本披露使用液体 / 液体分离代替某些步骤中的过滤，由此回避过滤方法固有的粘度局限性。过程流的粘度受木质纤维素生物质的初始水解程度影响。过滤方法的一个技术问题在于通过 C₁-C₂ 酸 / 有机溶剂混合物 257 的蒸发进行的浓缩的半纤维素和木质素糖浆 268 (参见图 2) 的固体的浓缩受到限制，随着蒸发进行而产生高粘度。当使用过滤进行分离时，仅可进行蒸发以在浓缩的半纤维素和木质素糖浆中形成约 40% 固体的浓度，因为后续过滤步骤由于高粘度而变得不实用。在本披露中，使用液体 / 液体分离使得可进行蒸发直到在浓缩的半纤维素和木质素糖浆 268 中达到至少 52% 固体的浓度。固体浓度水准越高，在后续纯化步骤中便可使用越少量的酸和溶剂。

[0026] 本披露对过滤方法的另一项改良是降低方法中使用的水量。因为过滤方法使用大量的水用于洗涤和分离，后续的乙酸分离由于众所周知的形成乙酸和水的非共沸混合物而变困难和昂贵。尽管这些混合物并非真正的共沸物，但从乙酸与水的非共沸混合物回收乙酸在经济上是不实用的。本披露的方法使用实质上降低的水量。因此，回收酸和溶剂，尤其分离水与酸混合物的成本变得不太成负担。

[0027] 本披露对过滤方法的另一项改良是降低用于接触浓缩的半纤维素和木质素糖浆 268 的溶剂体积。当从具有 40% 溶解固体含量的浓缩的半纤维素和木质素糖浆 268 进行半纤维素和木质素的沉淀时，向一份浓缩的半纤维素和木质素糖浆 268 中添加 3 到 4 份乙酸乙酯以萃取水并且产生可过滤的沉淀物。在本披露中，向具有 52% 溶解固体含量的一份浓缩的半纤维素和木质素糖浆 268 中仅添加一份乙酸乙酯。后续相分隔引起所希望的半纤维素和有机不溶性木质素与水性乙酸盐和具有显著更少的乙酸乙酯的有机可溶性木质素的分离。本披露通过避免用水稀释乙酸以及与从适用于再循环的浓缩物中的这一物料流回收乙酸相关的能量和设备的高成本而解决主要成本。此外，当使用过滤方法的水沉淀步骤回收半纤维素以供用于发酵的水解使用时，所得半纤维素流中的乙酸浓度可使半纤维素由于乙酸的抑制性浓度而不适用于发酵。这一问题通过本发明的方法得到改善。

[0028] 本披露对过滤方法的另一项改良是在基于溶剂的从富含半纤维素 / 糖的部分 322 回收乙酸时避免乳液形成。在基于过滤的方法中，如果尝试用溶剂萃取乙酸，那么富含半纤维素 / 糖的部分中较大的水含量引起形成难处理的乳液。本披露使用降低的水量，所以不会发生乳液形成。

[0029] 本披露对过滤方法的另一项改良是回收木质素有机可溶性木质素和非有机可溶性木质素的两个部分。可以预期这些新颖的木质素部分具有不同特性；实际上，可以预期来自任何木质纤维素生物质的相应木质素部分具有只有源生物质才有的特性。

[0030] 乙酸水解。图 2 示出了本发明的一个方面,关于利用乙酸和 C₁-C₂ 酸可混溶的有机溶剂从木质纤维素生物质 10 分离和回收半纤维素和木质素。该方法使用乙酸作为 C₁-C₂ 酸并且乙酸乙酯作为 C₁-C₂ 酸可混溶的有机溶剂作为一种优选方法示出,但是,也可以使用甲酸或甲酸与乙酸的混合物作为乙酸的替代物并且可以使用其他 C₁-C₂ 可混溶的有机溶剂作为乙酸乙酯的替代物。

[0031] 在步骤 200 将木质纤维素生物质 10(由玉米秆举例说明)与乙酸混合。乙酸与木质纤维素生物质的最终比率以 wt:wt 计应该优选在 3:1 到 5:1 酸:干燥固体范围内,这排除了乙酸和木质纤维素生物质的水含量。更低和更高的乙酸与干燥固体比率将起作用,但不经济。待使用的乙酸的浓度取决于木质纤维素生物质 10 的水分含量是可变的,只要达到以上提及的乙酸与干燥固体比率即可。在被干燥到约 8% 的水分含量的玉米秆木质纤维素生物质 10 的情况下,4.5 升 70% 乙酸/千克生物质是充足的。

[0032] 当使用甲酸时,水含量应该更低以实现木质素的有效溶解。80% -90% 的甲酸浓度起良好作用,然而更高的含水量并非如此。因为乙酸是更疏水的,所以它包容更多水以溶解相同量的木质素。在步骤 205,将经过酸化的木质纤维素生物质 10 加热到一个温度并且持续一段时间,该温度和时间足够将一个第一部分的半纤维素和木质素由生物质 10 水解溶解,形成一个第一水解混合物 206。优选地,该加热 205 在搅拌下或在物理翻滚剂下进行,以在该加热和水解过程 200/205 期间向木质纤维素生物质 10 施加机械力。任选地,在某些实施例中,该初始水解 200/205 中所用的乙酸可以补充有不超过 0.25% 到 1% w/v 的无机酸,如 HCl 或硫酸。包括少量无机酸引起半纤维素的水解和溶解改良,然而,还导致一些溶解的 C5 糖降解并且导致尤其将获得的半纤维素部分的无机(灰分)含量增加。此外,如果所希望的是用硫酸补充乙酸,那么另外必需中和该硫酸并且将其以硫酸盐形式回收。如下文和名称为纤维素分解酶组合物和其用途(Cellulolytic Enzyme Compositions and Uses Thereof)的共同待决的临时申请号 61/538,211 中所述,残余硫与可以用于化学转化在某些生物炼制操作中可以是令人希望的糖的某些催化剂不相容,并且还可能会导致形成可能会干扰使用纤维素分解酶、半纤维素分解酶以及酯酶的后续酶促步骤的硫酸酯。因此,在某些实施例中,硫酸特定地被排除在酸水解步骤 205 和 215 外。

[0033] 半纤维素和木质素的水解释放的温度和时间条件是至关重要的。如果温度太低或时间太短,那么半纤维素和木质素的水解释放将是不充足的。意外的是,发现过度水解对于可用物质的回收是不利的。如果温度太高或时间太长,那么可能会发生纤维素和半纤维素向单糖的不希望的水解,并且将形成干扰后续半纤维素和木质素沉淀的其他反应产物,当反应温度和/或时间过度时,导致形成一种胶质沉淀物。温度应该在 120°C -280°C 范围内,并且时间应该在 5-40 分钟范围内。在一个具有 70% 乙酸的实验室实施例中,将温度在 10 分钟内升高到 165°C,随后经 3 分钟快速降低到 150°C 的温度,此后经 30 分钟时间段逐渐冷却到 100°C。在一个工厂实施例中,使用 165°C 的温度持续 1-10 分钟的时间段。

[0034] 第一水解步骤 200/205 形成含有一种富含半纤维素和木质素的可溶性第一水解产物 207 和一种不溶性木质纤维素残余物部分的第一水解混合物 206。在步骤 210,将这些物质通过适合技术(如过滤或离心)分离。将固体物质以第一木质纤维素饼 208 形式回收,该第一木质纤维素饼至少部分地耗乏半纤维素和木质素并且含有至少部分酰化的纤维素(例如对于乙酸和甲酸来说,对应地是乙酰基纤维素酯或甲酰基纤维素酯)。在步骤 215,

将该第一回收的木质纤维素饼 208 用乙酸充分洗涤,以进一步释放结合的半纤维素和木质素。优选的是,将用于该洗涤的乙酸升温到约 40°C -50°C 的温度。任选地但未必,第一木质纤维素饼 208 的酸洗涤可以包括使用与在此前文提及的在步骤 200/205 的第一回合中所用相同的酸和热条件的第二回合的热处理。该酸洗涤 215 是否应该在高温下进行取决于木质纤维素生物质 10 中的半纤维素和木质素含量和结构。当木质纤维素生物质 10 如在木质来源的情况下具有高木质素或半纤维素含量时,那么第二回合的加热 220 是优选的。乙酸的浓度优选地在此洗涤步骤 215 比在水解步骤 200 更高,这是由于由水解释放的水和由木质纤维素饼 208 用在步骤 200 所用的乙酸的初始处理释放的水的稀释。在玉米秆作为木质纤维素生物质 10 的情况下,在酸洗涤步骤 215 中使用 90% 乙酸。该酸洗涤产生一种酸洗涤混合物 209,在步骤 225 将该酸洗涤混合物通过离心或过滤来回收,得到一种与该经过酸洗涤的木质纤维素饼 214 分离的包含其他半纤维素和木质素的液体酸洗涤部分 212,该经过酸洗涤的木质纤维素饼已经耗乏大部分半纤维素和木质素并且包含进一步酰化的纤维素。

[0035] 在一种优选方法中,在步骤 230,将第一水解产物部分 207 与酸洗涤部分 212 混合,以形成组合的乙酸可溶物溶液 219。然后在步骤 250 优选地将此组合的乙酸可溶物溶液 219 蒸发,以达到至少 30% wt/vol 的溶解固体含量,形成一种浓缩的可溶水解产物 221。

[0036] 分开地,在步骤 240,将第二木质纤维素饼 214 用乙酸乙酯或其他 C₁-C₂ 酸可混溶的有机溶剂洗涤,以将乙酸和剩余半纤维素和木质素从第二木质纤维素饼 214 移除。用于洗涤 240 该第二木质纤维素饼 214 的 C₁-C₂ 可混溶的有机溶剂的总量优选地是约与第二水解步骤 220 中所用的 C₁-C₂ 酸 215 的第二量相同的量。该洗涤可以用总体积分批地进行,或优选地总体积以不连续增量应用以将乙酸的移除最大化并且保留半纤维素和木质素。用于该洗涤的乙酸可混溶的有机溶剂的量应该足够将该乙酸从乙酰化纤维素纸浆充分洗涤。一种至少 3 体积(升)乙酸可混溶的有机溶剂/重量(千克)纸浆的总洗涤是适合的。该总洗涤优选地在三个或更多个不连续连续阶段中递送以便递送整个洗涤量。

[0037] 该洗涤产生一种液体有机溶剂/乙酸洗涤部分 216,在步骤 245 通过过滤将该洗涤部分与第二木质纤维素饼 214 分离。在步骤 245 所用的过滤介质应该具有孔隙,足够大以允许不溶性半纤维素和木质素与有机洗液通过,又足够小以将更高分子量纤维素纤维的固体物料保留在经过酸洗涤的饼 214 中,该经过酸洗涤的饼在过滤之后以经过有机溶剂洗涤的酰基纤维素纸浆 218 形式保留。用于此过滤步骤 245 的适合的过滤介质是具有对应于 60 网筛(标称筛直径为 250 微米)的孔径的过滤介质。

[0038] 在步骤 255,将有机溶剂/乙酸洗涤部分 216 与浓缩的水解产物 221 大致等体积地组合,形成 C₁-C₂ 酸/有机溶剂混合物 257,将该混合物搅拌一段充足时间,以将所获得的任何不溶性半纤维素和木质素溶解于有机溶剂洗液 216 中。然后在步骤 265,将 C₁-C₂ 酸/有机溶剂混合物 257 蒸发,达到 40% wt/vol 的溶解固体含量,以形成一种浓缩的半纤维素和木质素水相 268。

[0039] 在用于进一步加工浓缩的半纤维素和木质素水相 268 的一个第一优选方法中,将一个第二量的 C₁-C₂ 可混溶的有机溶剂以足够使半纤维素和木质素沉淀的量添加到浓缩的半纤维素和木质素水相 268 中。在 40% 的溶解固体含量下在乙酸和乙酸乙酯的混合物作为用于水相 268 的溶剂系统的情况下,1 份水相 268 比 3 到 4 份乙酸乙酯的比率足以产生一种可过滤的沉淀物。在步骤 275,将此半纤维素和木质素沉淀物 277 与乙酸乙酯滤过物 278

分离。任选地,可以将该半纤维素和木质素沉淀物 277 用另外量的该 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂洗涤,以移除残余的 C_1-C_2 酸。

[0040] 然后在步骤 280,将半纤维素和木质素沉淀物与温水混合以使半纤维素溶解,形成一种可溶半纤维素水性部分 289 和一种不溶性木质素部分 287,在步骤 285 通过过滤或离心将这些部分进行分离。任选地,可以将不溶性木质素部分 287 用一个第二回合的温水洗涤,以从沉淀物萃取更多的半纤维素。出人意料地,据发现,用于使半纤维素溶解和将木质素从沉淀物分离的水的温度和冷却是至关重要的。用水将半纤维素和木质素沉淀物加热到 95°C 、然后冷却到 60°C 使得木质素聚结成显著更易于过滤和洗涤的更大颗粒。相比之下,加热到 120°C 实际上引起木质素形成固体块,该固体块给半纤维素的处理和回收造成问题。

[0041] 在图 2 中描绘的总体实施例中,将 C_1-C_2 酸(乙酸)和 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂(乙酸乙酯)由该方法回收并且再循环用于持续使用。因此,举例来说,在步骤 290,将所回收的乙酸乙酯滤液 278 蒸发,以回收乙酸乙酯,留下一种暗色残余物 291。在步骤 295,将在步骤 290 通过蒸发回收的乙酸乙酯和乙酸与乙酸/乙酸乙酯滤液 261 和在步骤 250 由蒸发该水解产物回收的乙酸合并。然后在步骤 298,通过蒸馏将这些合并的物质分离,以从乙酸乙酯回收乙酸。

[0042] 图 2 中描绘的该方法中所用的几乎所有乙酸都以流的形式使用,可以容易通过简单蒸馏将这些流与 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂而非水分离。乙酸与乙酸乙酯的组合特别有效。该方法中所用的 C_1-C_2 酸可混溶的溶剂是针对其使木质素和寡糖两者以及一些单糖从乙酸沉淀的能力进行选择。它们也易于通过简单蒸馏与乙酸分离。将乙酸或甲酸与水组合使用以从纤维素纸浆分离半纤维素和木质素的现有技术的方法存在产生水酸共沸物混合物的缺点,这些共沸物混合物更难以回收和再循环用于持续使用。本发明的方法主要依赖于乙酸与可混溶的有机溶剂的组合。

[0043] 图 9 示出了本发明的用于进一步加工浓缩的半纤维素和木质素水相 268 的一个第二优选方法,关于从木质纤维素生物质分离和回收 C5 和 C6 糖、有机可溶性木质素、有机不溶性木质素以及乙酸盐,特别是当使用乙酸作为 C_1-C_2 酸时。在第二优选方法的一个示例性实施例中,含有 8% 水分的玉米秆与约 70% 乙酸溶液一起在旋转反应器中在 163°C - 171°C 下水解 10 分钟。使反应器冷却并且压缩和过滤已经水解的秆以提供第一水解产物 207(图 2) 和乙酰化木质纤维素饼 208。乙酰化木质纤维素饼 208 与一个第二量的乙酸在 60°C 下接触并且过滤以产生经过酸洗涤的酰化木质纤维素饼 214 和酸洗液 212。经过酸洗涤的乙酰基纤维素饼 214 与乙酸乙酯接触两次并且过滤以产生经过乙酸乙酯洗涤的乙酰基纤维素纸浆 218 和乙酸乙酯洗液 216。第一酸水解产物与酸洗液组合以形成组合的乙酸可溶物 209。通过蒸发从组合的乙酸可溶物回收乙酸,形成蒸发物(浓缩物)221。将该蒸发物与乙酸乙酯洗液 216 组合以形成乙酸乙酯:乙酸 50:50 混合物 257。通过蒸发 265 回收乙酸乙酯,形成富含半纤维素和木质素的浓缩的半纤维素和木质素水相 268。

[0044] 在图 9 中展示的用于通过液体/液体分离实现浓缩的半纤维素和木质素水相 268 的分离的第二优选实施例 300 中,浓缩的半纤维素和木质素水相 268 与第一量的乙酸乙酯 310 接触使得 5 到 7.5 份体积的乙酸乙酯或其他 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂添加到 5 份体积的浓缩的半纤维素和木质素水相 268 中以通过液体/液体分离来移除乙酸。意外地,发现在 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂与浓缩的半纤维素和木质素水相 268 的这些比率情况下,发

生相分离而未形成沉淀物。此外,发现 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂的量对于引起相分离和防止形成沉淀物是至关重要的。对于浓缩的半纤维素和木质素水相 268, 1 到 1.5 份体积乙酸乙酯与 1 份体积水性浓缩的半纤维素和木质素水相 268 的比率足以引起相分离而不形成沉淀物。重要的是,在这些条件下,与图 2 中所描绘的第一实施例相比使用显著更少的溶剂。使用更少量的 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂用于乙酸萃取不仅引起液体/液体分离,由于使用更小体积的溶剂,它还降低后续溶剂回收的费用。

[0045] 将混合物快速分成两个相:含有大部分糖和有机不溶性木质素(约一半的木质素)的胶质重水相;和含有有机可溶性木质素、乙酸盐部分、乙酸乙酯以及乙酸的有机上清液相。从重水相倾析有机上清液相。重水相(一份)与乙酸乙酯或其他 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂(约一份)接触(洗涤)并且在 50°C 下混合。再次分离混合物,在重水相上方形成一个第二有机上清液;倾析第二上清液。乙酸乙酯(约一份)再次与重水相接触并且在 50°C 下混合。再次分离混合物,形成一个第三有机上清液和包含经过洗涤的重水相 312 的一个第一相。倾析第三有机上清液。最终,经过洗涤的重水相 312 包含大部分 C5 和 C6 糖以及约一半的木质素并且耗乏乙酸。富含溶剂的有机上清液相包含有机可溶性木质素、乙酸盐、乙酸以及乙酸乙酯。任选地,经过洗涤的重水相 312 可以用另外量的 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂洗涤以移除残余的乙酸。图 9 中描绘的方法中所用的几乎所有乙酸都以流的形式使用,可以容易地通过简单蒸馏将这些流与 C_1-C_2 酸可混溶的有机溶剂而非水分离。乙酸与乙酸乙酯的组合特别有效。针对诱导相分离的能力选择用于该方法的 C_1-C_2 酸可混溶的溶剂。可以通过分隔乙酸乙酯和乙酸与富含糖的水相来实现显著经济增益。

[0046] 仍参看图 9,组合并且混合有机上清液以形成有机上清液相(第二相)316;形成少量焦油状沉淀物,将它分离并且添加到经过洗涤的重水相 312 中。乙酸与乙酸乙酯一起分隔到有机上清液中,引起含有糖和木质素的经过洗涤的重水相 312(第一相)中的乙酸含量降低。

[0047] 木质素的部分分离。相分离成一个第一相(经过洗涤的重水相)和一个第二相(有机上清液相)引起木质素部分分离成有机可溶性木质素和有机不溶性木质素部分。玉米秆木质素部分分离成有机可溶性木质素和有机不溶性木质素产生木质素部分,预期这些木质素部分中的每一种具有基于玉米秆的某些特性。因为木质素是缺乏所定义的主要结构的异质性聚合物,所以木质素的特征化是基于特性或来源而非结构。本发明的方法不使用硫酸,因此所产生的木质素部分不含硫。类似的方法步骤可以应用于来自其他来源的木质素。可以预期来自每种来源的有机可溶性木质素和有机不溶性木质素的特性,以及对羟基苯基醇、愈创木基醇以及丁香醇的相对量和键联具有基于木质素来源并且可能是木质素来源所特有的某些特性。木质素的来源包括来自针叶树(如云杉、雪松、松树以及红木)的软木木质素;硬木木质素,如来自枫树、白杨、橡树、桉树以及椴木的木质素;茎秆木质素,如来自秸秆、玉米、芥花、燕麦、稻谷、高粱、小麦、大豆、大麦、斯佩耳特小麦以及棉花的木质素;来自禾本植物(如竹子、芒草、甘蔗、柳枝稷、草芦、大米草)的禾本植物木质素。

[0048] 回收有机不溶性木质素。使经过洗涤的重水相(第一相)与水接触,引起木质素凝结,其中富含 C5 和 C6 糖的相(可溶性半纤维素相)与凝结的有机不溶性木质素分离。经过洗涤的重水相 312(1 份)与水 320(2 份)接触,由此形成疏松的有机不溶性木质素的沉淀物。使混合物沉降,由此观测到透明的棕色液体(约 2.5 份)和沉淀物(约 0.4 份)。

可以倾析上层相并且用 0.6 份水洗涤沉淀物。可以过滤沉淀物并且洗涤水与透明的棕色液体的组合。在一个优选实践中,在经过洗涤的重水相 312(1 份)与水 320(2 份)接触的步骤之后,混合物加热到 95°C 同时混合,促进沉淀的木质素的凝结。使混合物在混合下冷却到 50°C,并且接着过滤 328。用于半纤维素溶解和木质素与沉淀物分离的水的温度和冷却是至关重要的。将半纤维素和木质素沉淀物与水一起加热到 95°C,接着冷却到 50°C,使木质素聚结成更大的粒子,这些粒子比经过洗涤的重水相 312(1 份)与水 320(2 份)接触时形成的疏松的有机不溶性木质素沉淀物更易于过滤和洗涤。在过滤步骤 328 之后,获得富含半纤维素/糖的部分 322(3.3 份)和木质素饼。木质素饼用 0.8 份水 325 洗涤并且干燥以产生有机不溶性木质素 326。

[0049] 回收 C5 和 C6 单糖以及乙酸 富含半纤维素/糖的部分 322 中的少量乙酸中的一些以乙酸盐形式存在。通过向富含半纤维素/糖的部分 322 中添加硫酸以将乙酸盐转化成游离乙酸来将富含半纤维素/糖的部分 322 中的乙酸盐转化成游离乙酸。接着在步骤 340 中,混合物与相同体积的乙酸可混溶的有机溶剂(乙酸乙酯)接触。形成两个液体相并且易于分离而不形成乳液。形成了包含耗乏乙酸的 C5+C6 糖的水相 342(第三相),并且形成了包含乙酸乙酯与回收的乙酸的有机相 346(第四相)。在存在大量水的情况下,这一相分离将由于形成乳液而不实用。耗乏乙酸的 C5+C6 糖相 342 可以用乙酸乙酯再萃取。耗乏乙酸的 C5+C6 糖相 342 呈热塑性集结粒形式,它富含 C5 和 C6 糖并且适用于发酵,如 SHF。346 中的乙酸和乙酸乙酯可容易地分别回收以用于再循环到过程中。

[0050] 分离包含有机上清液的第二相。包含有机上清液 316 的第二相经历蒸发 330 以回收从包含水性上清液糖浆 332 的水相分离的流 336 中的 C₁-C₂ 酸可混溶的有机溶剂和乙酸。如图 2 中所描绘的整体实施例中所概述,从过程回收乙酸和 C₁-C₂ 酸可混溶的有机溶剂并且回收用于继续使用。仅通过蒸馏容易地分离 C₁-C₂ 酸可混溶的溶剂与乙酸。将乙酸或甲酸与水组合使用以从纤维素纸浆分离半纤维素和木质素的现有技术的方法存在产生水-酸共沸物混合物的缺点,这些共沸物混合物的回收和再循环用于持续使用是远为更加困难并且昂贵的。本发明的方法主要依赖于乙酸与 C₁-C₂ 酸可混溶的有机溶剂的组合,避免水共沸物以及促进酸和溶剂两者的显著更经济的回收和再循环。

[0051] 水性上清液糖浆 332(一份)与水 350(一份)接触以引起相分离,以形成第五相和第六相,该第五相包含富含乙酸盐并且有机可溶性木质素 352 含量降低的水相并且该第六相包含富含有机可溶性木质素 356 的相。将两相混合物加热到 90°C 同时搅拌以使乙酸乙酯蒸发。加热还有助于萃取水溶性组分(如乙酸盐)到水性第五相中。将两相混合物冷却到 40°C,并且通过蒸发来移出和浓缩水性第五相 352 以富集乙酸盐,如乙酸钾。在一个优选实施例中,有机可溶性木质素相再次与水接触并且加热。在这一实施例中,水洗液与水性第五相组合并且蒸发。可将此水相干燥并且用于肥料。将经过水洗的有机可溶性木质素第六相冷却,研磨并且干燥以产生有机不溶性木质素 356。通过用乙酸乙酯萃取获得木质素部分的特征在于具有高自由基清除指数(RSI),潜在地使这一木质素适用作稳定剂。

[0052] 通过以本披露中所描述的方式进行液体/液体分离,可以将切短的玉米秆或其他木质纤维素生物质部分分离成包含了耗乏乙酸的 C5+C6 糖 342、有机不溶性木质素 326、有机可溶性木质素 356 以及乙酸盐水溶液 352 的产物。另外,防止乳液形成,使用体积实质上降低的乙酸乙酯,并且易于回收乙酸乙酯和乙酸两者。图 9 中描绘的方法中所用的几乎所

有乙酸都以流的形式使用,可以容易地通过简单蒸馏将这些流与 C₁-C₂ 酸可混溶的有机溶剂而非水分离。

[0053] 乙酸与乙酸乙酯的组合特别有效。用于该方法中的 C₁-C₂ 酸可混溶的溶剂是针对其使木质素和寡糖两者以及一些来自乙酸的单糖沉淀的能力,以及它们通过简单蒸馏从乙酸分离的简易度而选择。

[0054] 可溶半纤维素部分的组成分析。使一种通过前述方法获得的可溶半纤维素部分 289 的样品经历关于单体糖、酸可水解糖、木质素以及乙酸含量以及其他元素取代基的详细化学分析(参看表 21,实例 1)。在呈酸可水解寡聚物和单体糖形式的全部碳水化合物中,约 19%是单体 C5 和 C6 糖,并且约 81%呈可水解寡聚物(半纤维素寡聚物)形式。这些一起占该样品的总质量的约 68%。木质素含量仅是质量的 0.28%。少量乙酸在该方法之后得以保留,占质量的约 1.2%。用以产生乙醇的发酵中所用的大部分生物体可以包容高达 1% w/v 乙酸,但优选在约 6 的 pH 下远低于 0.5% w/v 的浓度。如果希望的话,乙酸含量可以通过在步骤 280 溶解于水中之前用乙酸乙酯或其他乙酸可混溶的有机溶剂洗涤该半纤维素/木质素沉淀物 277 来减小。在此情况下,优选的是使用一种极性更小的乙酸可混溶的溶剂,如甲基乙基酮、丙醇等,以避免由该可溶半纤维素部分 289 移除单体糖。

[0055] 根据前文的一个示例性实践,质量分布如下:由 1.5kg 固体含量是 92%的切短的玉米秆(1380g 起始固体物质),在该经过乙酸乙酯洗涤的纸浆 218 中回收约 810 克,其中约 80%呈纤维素形式并且它还含有约 10%戊糖。该浓缩的半纤维素和木质素水相 268 是约 50%溶解固体,并且包含约 10%糖和 60%木质素。由该过程,在该半纤维素木质素沉淀物部分 277 中回收约 525g 该起始固体物质,其中约 45%呈半纤维素 289 形式并且其余呈木质素 287 形式。

[0056] 纤维素纸浆的组成分析 通过 ANKOM™ 纤维分析方法(沃格尔(Vogel)等人,1999)和由国家可再生能源实验室(NREL)规定的标准方法分析该纤维素纸浆 218 的纤维素和木质素含量。木质纤维素原料的组成分析(Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks)(斯勒伊特(Sluiser)等人,2010)。由如上文所述加工玉米秆生物质 10 秆获得的该纤维素纸浆 218 的若干湿润和干燥部分的分析提供在表 1 和 2 中。通过 ANKOM™ 方法进行的分析(表 1)表明,纤维素代表总干物质的 85.5%到 88.4%,半纤维素以 0.7% -3.5% 的范围存在,并且木质素以 1.0% -2.3% 的范围存在。在用一种乙酸和硫酸组合处理的样品中,在增加的硫酸下获得一个更高浓度的纤维素,而半纤维素减少,与半纤维素的更大水解一致。比较起来,用 NREL 方法分析的样品(表 2)指示一个在 62.2% -77.3% 范围内的更低纤维素浓度的存在,而通过此方法半纤维素和木质素更高(3.2% -15.8% 和 1.0% -5.8%)。当用一种乙酸和硫酸组合处理样品时,还观测到纤维素含量增加与平行半纤维素减少。虽然当与 NREL 方法相比时,通过 ANKOM™ 方法进行的分析指示纸浆有一定变化性并且总体纤维素组成的含量更低,但物质平衡测量指示通过两种方法大部分固体有一致组成(范围是 94.1% -108.8%,平均值是 99.1%)。

表 1

通过 ANKOM™ 纤维分析方法对纤维素纸浆 218 进行的组成分析

样品	说明	纤维素	半纤维素	木质素

		干物质%	干物质%	干物质%
样品 1A	湿润秆纸浆滤饼样品 A	85.50	1.11	1.54
样品 1B	湿润秆滤饼纸浆样品 B Sa	88.41	2.89	1.04
样品 1A. d	干燥玉米秆纸浆样品 A	85.33	3.53	1.87
样品 1B. d	干燥玉米秆纸浆样品 B	88.02	0.41	1.45
湿滤饼 A	湿滤饼 (70% AcOH w/0.25% H ₂ SO ₄)	85.27	2.50	2.30
湿滤饼 B	湿滤饼 (50% AcOH w/0.5% H ₂ SO ₄)	87.91	0.71	1.83

表 2

通过 NREL 方法对纤维素纸浆 218 进行的组成分析

说明	灰	蛋白	木质	葡聚	木聚	半乳聚	阿拉伯	乙酸	总%
	分%	质%	素%	糖%	糖%	糖%	聚糖%	酯%	
样品 1A. d	6.45	1.75	4.56	78.85	12.64	0.68	0.78	3.09	108.80
样品 2	5.67	0.63	3.01	68.91	15.84	0.79	0.87	2.33	98.04
样品 3	8.16	1.19	2.74	72.11	10.11	0.71	0.61	2.65	98.27
样品 4	9.77	1.17	4.49	77.26	3.23	0.68	0.61	3.26	100.47
样品 5	8.14	2.73	0.95	71.64	10.77	0.60	0.50	2.64	97.96
样品 6	16.21	3.61	0.12	62.20	8.35	0.46	0.91	2.23	94.09
样品 7	11.58	0.81	3.74	71.50	6.43	0.52	0.62	2.44	97.64
样品 8	7.04	1.50	5.82	67.26	12.02	0.44	1.03	2.35	97.47

[0057] 处理可溶半纤维素 289 或纤维素纸浆 218 以制造一种富含 C6 或 C5 的糖浆。该纤维素纸浆 218 主要是纤维素（以重量计 62.2% 到 88.4%，取决于分析方法和所分析的样品），它当通过一种适合纤维素分解酶混合物消化时应产生一种富含 C6 糖（主要是葡萄糖）的糖浆。该富含溶解的半纤维素的部分 289 是一种几乎不含木质素的半纤维素流，并

且由木糖单体和寡聚物混合物与微量的阿拉伯糖、葡萄糖以及其他己糖组成。当由一种适合半纤维素分解酶混合物充分消化时,该富含可溶半纤维素的部分 289 应产生一种主要富含 C5 糖的糖浆。术语“纤维素分解酶”和“半纤维素分解酶”以及其混合物意指一种或多种(例如“若干”)对应地使一种含有纤维素或半纤维素的物质水解的酶。此类酶的实例提供在名称为纤维素分解酶组合和其用途的待决的美国临时申请号 61/538,211 中。然而,本发明的申请人发现,可用于使纤维素和半纤维素消化的常规纤维素分解和半纤维素分解酶混合物在通过对玉米秆(作为木质纤维素生物质)进行乙酸处理制备的纤维素纸浆和可溶半纤维素部分的情况下并不有效地操作。初始结果显示,溶解的 C5 糖浆和 C6 纸浆的酶促水解即使在高酶负载下也缓慢地进行,并且所释放的单糖的量少于预测。

[0058] 初始半纤维素 289 水解。对该可溶半纤维素部分 289 进行酶水解,以将可溶性半纤维素寡聚物转化为单体以供发酵。通过苯酚-硫酸方法对此部分进行的总碳水化合物分析指示 65% w/w 干质量计的总碳水化合物浓度。初始酶水解使用以 4:1 比率混合的以商品名称 Cellic CTec(一种或多种纤维素酶)和 Viscozyme L(一种或多种果胶酶)获自诺维信有限公司(Novozymes A/S)(丹麦巴格斯瓦德(Bagsvaard, Denmark))的商业酶的混合物,在 2% w/w 干基可溶性半纤维素 289 固体的酶用量率下使用,这些固体用 50mM 柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)稀释到 10% wt/vol。样品在 50°C 下培育五天。结果提供在下表 3 中。这些结果指示在酶水解之后总碳水化合物的单体的 82.7% 的产率。仅约 80% 的总碳水化合物呈酸可水解半纤维素寡聚物形式,因此被转化为单体糖的半纤维素寡聚物的百分比仅是约 65%。

表 3

来自玉米秆的半纤维素的酶水解的结果

C5 部分	右旋糖	木糖	阿拉伯糖
	%, db	%, db	%, db
经过酶水解的	13	37.4	3.4
对照	6.3	18.2	3.5

[0059] 初始纤维素纸浆 218 水解 还对如上文所述制备的该纤维素纸浆 218 进行酶促水解。将两种来自诺维信的商业酶(Cellic CTec2(一种或多种纤维素酶)、Cellic HTec2(一种或多种木聚糖酶))的混合物用于纤维素纸浆部分的酶水解。还测试其他商业和非商业酶共混物。通过 ANKOM™ 纤维分析方法分析的纤维素纸浆 218 对于六个纤维素纸浆 218 样品来说,w/w 干基纤维素、半纤维素以及木质素对应地平均是 86.7%、1.8% 以及 1.7%。在低固体(10%)和高固体负载(20%)两者下进行实验室规模酶水解。低固体酶水解产生该纤维素纸浆 218 向葡萄糖和木糖的 87.8% 转化,而具有 20% 干燥固体负载的高固体酶水解实验得到向葡萄糖和木糖的超过 82.6% 转化(表 4)。两个实验中的酶水解都在 50°C 下进行五天。用于低固体酶水解的酶用量是 12mg 酶蛋白质/g 纸浆干燥固体。对于高固体酶水解来说,用量是 33mg 酶蛋白质/g 纸浆干燥固体。

表 4

由玉米秆获得的纤维素纸浆 218 在 10% -20% 干燥固体下的酶水解

	初始干燥固体	右旋糖	木糖	乙酸	酶水解产物干燥固体
	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg
10%固体	100	75.0	10.5	2.0	108
20%固体	200	130.8	31.6	0.7	217.1

[0060] 前述结果显示,该可溶半纤维素部分 289 和该纤维素纸浆部分 218 向单体糖的转化少于使后续发酵经济实用所需的转化。这些物质通过使生物质在高浓度的乙酸 (>70%) 存在下暴露于热量来制造。据推测,游离和结合糖中的一些可能已经变得被乙酰基取代,并且此乙酰化可能至少部分地抑制酶促活性。为测试此,将该纤维素纸浆 218 的样品用碱处理,以催化乙酸酯基团的脱酯。结果通过傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 来评估。图 3 示出了玉米秆纤维素纸浆 (顶部迹线) 和经过氢氧化铵处理的玉米秆纸浆 (下部迹线) 的 FTIR 光谱的差异。图 4 示出了在 1150cm^{-1} 与 2000cm^{-1} 之间的 FTIR 光谱,其中三个重要酯键由以下各项表示:在 1725cm^{-1} 下的 $\text{C}=\text{O}$ 酯拉伸;在 1366cm^{-1} 下的 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-\text{CH}_3$ 基团中的 $\text{C}-\text{H}$ 拉伸;以及在 1242cm^{-1} 下的乙酰基的 $-\text{CO}-$ 拉伸。一个代表着羧基的吸收的在 1700cm^{-1} 下的峰的不存在证实了,经过碱处理的样品不含酯化乙酸。

[0061] 此结果表明,根据图 2 对木质纤维素生物质 10 进行乙酸水解产生一种乙酰化的纤维素纸浆 218。更总体来说,由一种 C_1-C_2 酸处理一种木质纤维素生物质 10 产生一个该纤维素纸浆 218 以及该可溶半纤维素部分 289 的显著部分,通过该 C_1-C_2 酸水解 210 和洗涤步骤 220 酰化 (即碳水化合物部分将包含甲酰基酯或乙酰基酯)。因此,通过酶消化制造用于发酵的适合原料 C5 和 C6 糖糖浆需要在用适当酶混合物使纤维素聚合物或半纤维素寡聚物消化之前或结合该消化使这些酯去酰化。

[0062] 当该 C_1-C_2 酸是甲酸时制造的甲酰化碳水化合物酯是热不稳定的。因此,可以通过将该物质在一种水溶液中在 50°C 到 95°C 的温度下培育 0.5 到 4 小时来使甲酰化纤维素纸浆 218 或可溶半纤维素部分 289 去甲酰化,该条件如例如科伯利 (Chempolis),美国专利号 6,252,109 所述足以使碳水化合物去甲酰化。然而,乙酰化碳水化合物比甲酰化酯更稳定。乙酰基酯可以通过用一种碱 (alkali) (碱 (base)) 处理来去乙酰化。适合的碱包括氨 (氢氧化铵) 和苛性碱 (氢氧化钠)。因此,在酶促消化之前,将纤维素纸浆 218 和可溶半纤维素部分通过与碱性碱接触来处理。将经过乙酸处理的玉米秆纸浆样品制剂 218 用水稀释,以形成一种 8% 固体混合物。添加 NaOH 以将 pH 调节到 13。将混合物加热到沸腾,并且保持沸腾 10 分钟。在反应混合物达到室温之后,使用磷酸将 pH 调节到 5.0。将一种对照纤维素纸浆 218 类似地同时并且在相同固体含量下在无氢氧化钠处理或 pH 调节的情况下加热。将经过碱处理的样品调节为一种 5% 溶解固体混合物,并且针对乙酸进行分析,结果展示在表 5 中。

表 5

通过碱从纤维素纸浆 218 释放乙酸

	乙酸 (mg/g)

经过 NaOH 处理的	1.68
对照	0.75

[0063] 结果表明,与未经处理的对照相比,碱性处理释放更多乙酸。由加热碱性处理释放的乙酸提供了另外的证实,乙酰基通过在乙酸处理步骤期间形成的酯键共价键联到碳水化合物纸浆纤维分子。通过在此所述的方法制造的不同纤维素纸浆 218 部分的酯化程度在从 0.05 到 0.2 取代程度(即 5% -20% 的糖残余物被乙酰化)的范围内,这对应于纤维素纸浆部分的质量的 1.4% 到 6.6% w/w 乙酰基含量。

[0064] 为了证实去酯化是否将改进酶可消化性,使以上制备的经过处理的纤维素纸浆 218 样品在 5% 固体含量下在柠檬酸盐缓冲液和一种来自诺维信的商业纤维素酶共混物(Cellic Ctec)下经历酶水解。将酶处理在一个轮转热烤培育箱(Daigger FinePCR Combi D24)中在 50°C 下进行 96 小时。通过 HPLC 将经过酶处理的样品针对糖进行分析。表 6 提供了分析结果的概述。

表 6

碱处理对葡萄糖由玉米秆纤维素纸浆 218 酶促释放的影响

含量 mg/g	葡萄糖	木糖
经过 NaOH 处理的	12.8	4.0
对照	6.1	3.0

[0065] 结果表明,对碱性去酯化的纤维素纸浆 218 进行酶处理产生葡萄糖和木糖的一个实质上更高释放。结果进一步支持以下发现:在使用不同纤维素分解和半纤维素分解酶混合物的以上提及的酶促消化中,乙酸酯阻碍酶接近纤维素。推测起来通过移除乙酸酯,酶可以更佳地达到并且结合底物,并且因此,使更多纤维素纸浆 218 和半纤维素 289 纤维聚合物水解,导致更多葡萄糖和其他单体糖释放。结果还指示,在一个高压釜中在 121°C 下在氨的浓度是 0.1% 到 1% 的情况下加热 10 到 30 分钟;或在 50°C 的更低温度下在氨是 0.5 到 5% 的情况下加热 1 到 10 小时足以使大多数乙酰基由纸浆释放。

[0066] 清洁剂 进一步发现,非离子清洁剂可以实质上增加半纤维素分解和纤维素分解酶制剂的活性。将纤维素纸浆样品 218 用碱性 NaOH 处理,随后用一种商业酶纤维素酶共混物处理。测试许多清洁剂化学品以测定它们对于纸浆的酶水解的功能,这些清洁剂化学品包括 Tween-20(聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯)、Tween-40(聚氧乙烯脱水山梨糖醇单棕榈酸酯)、Tween-60(聚氧乙烯脱水山梨糖醇单硬脂酸酯)以及 triton X-100(4-辛基酚聚乙氧基化物)。酶反应包含 5% 纸浆固体 wt/wt 的一种 50 mM 柠檬酸盐缓冲液、商业纤维素酶共混物 Cellic Ctec II,具有或不具有清洁剂(例如 0.2% w/w 含量的 Tween-40)。在 6 天之后,将所得混合物通过 HPLC 针对葡萄糖进行分析。

表 7

Tween 40 对葡萄糖由纤维素纸浆 218 的释放的影响

添加剂	葡萄糖 (mg/ml)
Tween-40 补充	38
无添加的对照	20

[0067] 在另一个测试中,将来自经过乙酸处理的玉米秆的如在此所述制备但不通过碱处理来去乙酰化的纤维素纸浆 218 干燥,并且在高和低酶用量下、具有或不具有 Tween 40 下用诺维信的纤维素酶共混物 Cellic CTec2、诺维信果胶酶 Viscozyme L 或木聚糖酶 Htec2 半纤维素酶共混物进行处理。表 8 中提供的结果表明,Viscozyme 一贯比 Htec2 释放更多糖,并且重要的是,当该纤维素纸浆 218 不被去乙酰化时,在处理步骤中包括 Tween 40 导致糖事件的一个更高释放。结果还表明,高酶用量可以至少部分地克服在预处理期间因纤维素纸浆的乙酰化而对纤维素酶的抑制。此进一步表明,所测试的纤维素酶共混物具有一个低水平的存在的酯酶活性,并且在共混物中包括更多酯酶活性可以适用于减少纤维素酶负载。

表 8

纤维素酶 / Tween 40 提高葡萄糖由纤维素纸浆的释放

样品号	Tween 40 (0.02% w/w)	总酶 (%, v/db)	酶 2	右旋糖 (g/L), 通过 HPLC					
				第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 13 天	第 16 天	第 20 天
1	有	4.5	Viscozyme L	NL	NL	NL	109.0	121.2	128.4
2	无	4.5	Viscozyme L	NL	NL	NL	NL	NL	NL
3	有	4.5	Htec2	NL	NL	NL	NL	103.7	119.6
4	无	4.5	Htec2	NL	NL	NL	NL	NL	NL
5	有	25	Viscozyme L	NL	147.0	153.0	153.1	NS	NS
6	无	25	Viscozyme L	NL	115.1	129.0	124.3	NS	NS
7	有	25	Htec2	NL	133.6	149.5	152.7	NS	NS
8	无	25	Htec2	NL	107.0	121.3	129.2	NS	NS

[0068] 在另一个测试中,将在乙酸乙酯洗涤之后获得的该乙酰化纤维素纸浆 218 在过滤以移除任何游离乙酸之后,用水充分洗涤。向经过洗涤的样品中添加 NH_4OH , 达到 0.5% (v/

w) 的一个最终浓度。在 121°C 下处理样品 30 分钟, 以使样品去乙酰化。添加磷酸、缓冲液以及商业酶(以 DS 的 3% 投加) 以及 Tween-40(以 0.5% w/v 添加) 到经过碱处理的样品中, 以制造一种 15% 固体反应混合物。将样品放置在一个 50°C 培育箱中, 并且在 20rpm 下旋转。在 2 天的培育之后, 纤维素纸浆 215 开始液化。在第三天, 测量葡萄糖含量。随后每天移出另外的样品, 以针对葡萄糖进行检查。通过酶反应释放的葡萄糖图示在图 5 中。在 50°C 下培育 7 天之后, 释放据估计存在于纤维素纸浆 218 中的大多数葡萄糖。在 9 天之后, 水解产物的组成是(以 w/w 溶解物质计) 葡萄糖 12.56% (84% DM)、木糖 1.73% (11.5% DM)、灰分 2.0% (13.3% DM) 以及乙酸 0.56% (3.7% DM)。

[0069] 在 30°C 下在以 150rpm 旋转的被塞住的振荡器烧瓶中通过不同酵母菌株使经过 9 天酶处理的水解产物的等分试样发酵。以 2.5 亿个细胞/毫升的接种率接种培养物。在发酵期间 24 小时和 48 小时获得样品。将这些样品针对糖、有机酸以及乙醇进行分析。结果表明, 被工程化以将木糖用于发酵的所测试酵母菌株之一(即酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 424a, 获自印第安纳州拉斐特 (Lafayette, IN) 的普渡研究基金会 (Purdue Research Foundation)) 在 24 小时内产生 5.6% 乙醇 (v/v) 并且在 48 小时内使用 50% 木糖。

[0070] 表 7 和 8 中概述的结果表明, 与经过对照处理、不添加 Tween 40 的情况下的样品相比, 添加清洁剂到多种纤维素分解和半纤维素分解酶反应中导致葡萄糖有一个实质上更大释放。也可以适用于增强纤维素分解和半纤维素分解酶制剂的酶促活性的其他非离子清洁剂包括但不限于 Tween-20、Tween-60、Tween-80 以及 Triton X-100。待使用的清洁剂的数量应该在反应混合物的 0.01% 与 5% v/wt 范围内。

[0071] 酯酶的合并 尽管如上文在此所述, 酰化的纤维素纸浆 218 和半纤维素部分 289 的碱催化的去酯化改良了酶可消化性, 但它需要额外物质并且产生一种碱性反应混合物, 该碱性反应混合物必须在纤维素纸浆 218 和可溶半纤维素 289 部分的酶促消化之前经过 pH 调节。然而, 出人意料地发现, 这些部分也可以通过用一种酯酶共同处理来有效地去乙酰化。此发现部分基于对当用一种来自诺维信的商业半纤维素酶和纤维素酶混合物 (Cellic CTec2 和 HTec2) 处理纤维素纸浆 218 时所释放的乙酸的分析。此类酶制剂不被高度纯化以获得一种具有一种具体类型的酶促活性的蛋白质, 而实际上是具有不同的部分纯化的酶活性的混合物, 这些混合物包含在制备方法中共同纯化的其他酶的残余活性。在高酶负载下, 观测到该纤维素纸浆 218 的一定去乙酰化与酶共混物中存在的低水平的酯酶类型活性一致。此形成了力图通过添加另外的酯酶活性制剂到纤维素分解和半纤维素分解酶制剂混合物中来结合更多酯酶活性的基础。

[0072] 一种用于制造由对如在此所述制造的纤维素纸浆和半纤维素部分进行 C₁-C₂ 酸处理制成的 C6 和 C5 糖浆的适合酯酶应该呈现至少一种催化乙酰基由以下中的至少一者水解的活性: 一种聚合木聚糖、乙酰化木糖、乙酰化葡萄糖、乙酰化纤维素以及乙酰化阿拉伯糖。名称为纤维素分解酶组合物和其用途 (Cellulolytic Enzyme Compositions and Uses Thereof) 的共同待决的美国专利申请号 61/538, 211 描述了此种酯酶的至少一个实例, 表示为乙酰木聚糖酯酶 (AXE), 它可以用于实现如在此所述制造的纤维素纸浆 218 和可溶半纤维素部分 289 的得到改良的消化以提供改良的 C6 和 C5 糖浆。AXE 是一种催化乙酰基由聚合木聚糖、乙酰化木糖、乙酰化葡萄糖、乙酸 α -萘酯以及乙酸对硝基苯酯水解的羧酸酯酶 (EC. 3. 1. 1. 72)。其活性通过使乙酸对硝基苯酯在 pH 5.0 下乙酸盐缓冲液中去乙酰化

(提供了比色产物对硝基苯酚盐)来测量。将一个单位的 AXE 定义为在 25°C 下每分钟释放 1 微摩尔的对硝基苯酚盐的酶的量。名称为纤维素分解酶组合物和其用途的共同待决的美国专利申请号 61/538,211 提供了另外的数据,展现合并此种酯酶活性用于使在此所述的纸浆 218 和可溶半纤维素部分 289 消化提高了该物质向 C6 和 C5 糖浆的转化。

[0073] 发酵 将根据在此所述的方法制造的可溶半纤维素 289 以及耗乏半纤维素和木质素的纤维素纸浆 218 物质制剂用于制造适合作为用于被用以通过发酵制造多种产物的微生物的原料的 C5 和 C6 糖。多种用于利用此类物质的方案是可能的,取决于所用的生物体和被制造的发酵产物。大多数微生物可以利用通过使这些物质消化制造的 C5 和 C6 糖(作为用于细胞生长(生物质积聚)的一种碳源)的选项组。然而,生物质积聚仅是一种与最终发酵产物的产生的经济情况相关的因素。举例来说,虽然多种酵母可以将 C5 糖在好氧生长条件下用于生物质积聚,但大多数酵母通过在此类条件下发酵并不产生乙醇。相反地,在酵母由葡萄糖和其他 C6 糖产生乙醇的厌氧条件下,酵母属酵母不具有将 C5 糖 D-木糖和 L-阿拉伯糖转移到乙醇产生中所必需的代谢路径,除非它们已经用外源酶活性基因工程化以将 C5 糖转移到糖分解路径中。相比之下,细菌运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的经过基因工程化的菌株具有通过在厌氧条件下对或者 C5 或者 C6 糖发酵来产生乙醇的能力。再者发酵单胞菌属(*Zymomonas*),如酵母和大多数其他微生物显示出在摄取其他 C6 或 C5 糖之前优选首先摄取葡萄糖。

[0074] 关于由通过在此提供的方法制造的半纤维素 289 和纤维素纸浆 218 产生的 C5 和 C6 糖的消化和发酵的若干变化。在一个实施例中,首先将半纤维素 289 和纤维素纸浆 218 用酶分开地消化,以形成分开的 C5 和 C6 糖。接着,将这些原料供应给微生物以产生发酵产物。当将酶促消化与后续发酵分别地进行以形成一种糖浆时,此被称为分别水解和发酵,缩写是 SHF。

[0075] 在一种 SHF 方法中,在至多 70°C 的温度和 4.0-6.0 的 pH 下在连续混合下将通过本发明的方法制造的半纤维素部分 289 用包含纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、酯酶以及任选地蛋白酶活性的适当酶混合物消化,以产生一种富含 C5 的糖的糖浆。在该优选实施例中,半纤维素部分 289 的酶消化在 50°C-65°C 下在 5.0 的 pH 值下进行 1 到 7 天。为了产生大量的糖,酶消化反应混合物还包含一种如上文在此论述的非离子清洁剂,如 Tween 40。使用该清洁剂使得纤维素纸浆 218 或可溶半纤维素部分的固体含量在 10%-25% w/w 的范围内。然后将由消化产生的 C5 糖的糖浆或者直接用作发酵介质中的一种原料以使生物质积聚,或者使生物质积聚并且产生所希望的发酵产物。

[0076] 类似地,可以使如在此所述制造的纤维素纸浆 218 在悬浮于一种水性缓冲溶液(在 4.5-5.5 的 pH 下在 10%-25% 干燥固体下)中之后,在 50°C 的一个温度下使用包括一种酯酶的酶的一种纤维素酶共混物经历酶消化 5 天,以产生一种包括富含 C6 糖的糖浆的发酵原料。同样,在消化混合物中包括一种非离子清洁剂,如 Tween 40,该非离子清洁剂允许使用 10%-25% 纤维素纸浆的高固体含量以使 C6 糖的产率最大化。

[0077] 如果所希望的发酵产物是乙醇并且发酵微生物是酵母酿酒酵母的普通工业菌株,那么使酵母在好氧条件下单独在 C5 糖浆上生长一段时间,足以在一个第一阶段中积聚生物质。在一个第二阶段中,将发酵液用一种 C6 糖来源、优选地是葡萄糖或蔗糖或其混合物补充,并且使发酵在厌氧条件下进行一段时间,足以积聚乙醇。C6 糖来源可以完全由从如在

此所述的纤维素纸浆 218 制备的 C6 糖浆组成。

[0078] 如果所希望的发酵产物是乙醇并且发酵微生物是酿酒酵母的一种基因工程化的菌株,那么使酵母在厌氧条件下单独在 C5 糖的糖浆上生长一段时间,足以在一个第一阶段中积聚生物质和第一部分的乙醇。在一个第二阶段中,将发酵液用一种 C6 糖来源、优选地是葡萄糖或蔗糖或其混合物补充,并且使发酵在厌氧条件下继续一段时间,足以积聚一个第二部分的乙醇。C6 糖来源可以包括由如在此所述的纤维素纸浆 218 制备的 C6 糖浆。

[0079] 使用由在高酶、上表 4 中所述的高固体 (20%) 下使纤维素纸浆 218 消化获得的 C6 糖浆进行一种使乙醇发酵的 SHF 方法。测试多种商业和非商业菌株,包括酿酒酵母的能够使 C5 糖发酵以制造乙醇的木糖工程化的重组菌株。所测试的菌株包括一种内部酿酒酵母产生菌株 Y500 (阿彻丹尼尔斯米德兰公司 (Archer Daniels Midland Company), 迪凯特 (Decatur), 伊利诺伊州 (IL)); 一种衍生自 Y-500 的能够进行 D-木糖发酵的内部工程化的菌株,指定为 134-12; 一种由乐斯福集团发酵分部 (Fermentis division of the LeSaffre Group) (密尔沃基 (Milwaukee), 威斯康星州 (WI)) 获得的商业菌株,指定为 ER2; 以及一种被工程化用于木糖发酵的酿酒酵母 GMO 菌株,来自普渡大学 (Purdue University) 的南希郝 (Nancy Ho) (普渡研究基金会, 西拉斐特 (West Lafayette), 印第安纳州), 指定为 424a。在初始实验室规模实验中,运行分别的糖化和发酵试验,以测定使用木糖工程化的重组菌株 424a 的发酵能力,这描述于赛德拉克 (Sedlak) 等人《酶与微生物技术》(Enz. Microbial Technol.) 33, 19-28 (2003) 中。表 9 示出了使用来自去乙酰化玉米秆纸浆的 C6 和 C5 糖浆在 48 小时时间段内葡萄糖 (右旋糖) 和木糖的消耗和 8.5% v/v 产率乙醇的同时产生。

表 9

乙醇由来自经过乙酸处理的纤维素纸浆 218 的 C6 糖浆的产生

时间	右旋糖	木糖	乳酸	甘油	乙酸	乙醇
小时	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	%, v/v
0	146.9	25.9	0	12	1.0	0
24	0.5	11.3	0	13.5	1.2	6.3
42	0	9.4	0	17.8	2.6	8.5

在前 24 小时中几乎所有右旋糖和 56% 的木糖被消耗。

[0080] 使用由使玉米秆纤维素纸浆 218 消化获得的 C6 糖浆进行用以使乙醇发酵的 SHF 方法的其他研究,以产生一种乙醇溶液,该乙醇溶液对于通过蒸馏回收来说将是经济的。经济蒸馏通常达到有至少 6.5% 乙醇,这表明达到此浓度所需的糖溶液需要是约 10%。来自酶水解的糖溶液是 10 重量%进一步表明,酶水解必须在 15 重量% -20 重量%之间的高固体负载下进行。高固体酶水解带来了若干问题,如不充分混合、传热以及高粘度。尝试若干策略以由酶水解产生一种浓缩糖溶液,这些策略包括与蒸发浓缩结合的低固体酶水解;在低固体酶水解期间过程性添加固体;以及在表面活性剂添加下的最终高固体酶水解。初始实验由纤维素纸浆 218 的低固体 (6%) 酶水解的发酵与两倍蒸发浓缩产生 2.2% v/v 乙醇。(表 10) 后续实验由通过 9% 固体纤维素纸浆 218 (在初始固体溶解之后,添加纤维素纸浆

218 达到 14% 总固体) 的酶水解产生的物质的发酵产生 3% v/v 乙醇。(表 11) 由从 9% 固体纤维素纸浆 218 的酶水解两倍蒸发浓缩的物质产生 6% v/v 浓度的乙醇。(表 12) 蒸发浓缩给乙醇的商业生产增加了一个昂贵步骤, 因此测试纤维素纸浆 218 在表面活性剂添加下的高固体酶水解的替代方案。在 16.5% 固体纤维素纸浆 218 在表面活性剂添加下的高固体酶水解的振荡烧瓶发酵期间, 若干酵母菌株产生从 6.8% -7.1% v/v 的乙醇。(表 13) 最终, 将通过 20% 固体纤维素纸浆 218 在表面活性剂添加下的高固体酶水解产生的物质在振荡烧瓶中用酵母菌株 424a 进行发酵, 并且产生 8.3% v/v 乙醇。(表 14) 来自表 10-14 的数据 (包括纸浆干燥固体、所产生的糖浓度以及乙醇浓度) 的图解概述呈现在图 6 中。

表 10

C6 糖浆 6% 干燥固体和 2 倍浓缩下的振荡烧瓶发酵

时间	卤素干	DP3	DP2	右旋糖	木糖	乳酸	甘油	乙酸		乙醇
	干燥固体									
小时	%, w/w	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L		%, v/v
0	14.5	0.70	3.44	43.60	5.75	0.32	1.70	0.74		0.13
6	na	0.84	2.32	nd	4.52	0.44	4.11	1.38		2.20

表 11

C6 糖浆 9% 干燥固体 (有 5% 干燥固体的连续增加) 的振荡烧瓶发酵

时间	烘箱干燥固体	DP3	DP2	右旋糖	木糖	乳酸	甘油	乙酸		乙醇
小时	%, w/w	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L		%, v/v
0	12.7	0.94	5.84	62.00	8.13	nd	3.83	2.43		0.05
24	na	0.92	4.45	0.78	7.02	1.15	7.08	3.95		3.01

表 12

C6 糖浆 9% 干燥固体和 2 倍浓缩下的振荡烧瓶发酵

时间	烘箱干燥固体	DP3	DP2	右旋糖	木糖	乳酸	甘油	乙酸		乙醇
小时	%, w/w	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L		%, v/v
0	18.0	1.51	10.74	100.77	14.66	0.28	9.31	3.56		0.07
7	na	1.45	10.65	57.43	nr	0.46	8.11	3.51		2.07
24	na	1.74	8.60	1.36	15.05	0.75	13.37	5.09		6.00

表 13

C6 糖浆 16.5% 干燥固体用若干酿酒酵母菌株的振荡烧瓶发酵

时间	菌株	烘箱干燥固体 (%)	右旋糖	木糖	乳酸	甘油	乙酸		乙醇
小时			g/L	g/L	g/L	g/L	g/L		%, v/v
0	无	16.5	125.6	17.3	0.1	3.6	5.6		0.0
24	134-12	Na	1.6	12.7	0.6	8.8	5.2		6.8
24	424a	Na	0.4	10.5	0.4	9.4	5.6		7.1
24	ER2	Na	1.6	13.7	1.4	8.2	5.6		6.8
24	Y500	Na	1.7	13.2	0.4	8.3	5.8		6.8
48	134-12	Na	1.4	8.4	0.7	8.8	6.2		6.9
48	424a	Na	1.6	6	0.4	9.3	7.3		6.9
48	ER2	Na	1.5	12.8	1.4	8.5	7.5		6.8
48	Y500	Na	1.5	11.1	0.5	8.9	7.9		6.6

表 14

C6 糖浆 20% 干燥固体用重组酿酒酵母菌株 424a 的振荡烧瓶发酵

时间	卤素干燥固体	DP3	DP2	右旋糖	木糖	乳酸	甘油	乙酸		乙醇
小时	%, w/w	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L		%, v/v
29		1.4	675	1.0	20.4	nd	17.1	0.9		8.3
48		1.5	7.9	2.1	22.2	nd	16.5	0.9		8.0

[0081] 一种可以使用的替代方法被称为同时糖化和发酵（缩写：SSF）。在此种方法中，半纤维素部分 289 或纤维素纸浆部分 218 的酶促消化在一种还包括微生物的介质中进行。由于糖通过消化方法释放，因此它们由微生物消耗用于生物质积聚和 / 或发酵产物生产。任选地，还可以在该方法期间将一种分别的糖来源馈入到消化 / 发酵混合物中。一种 SSF 方法的一个益处是，所释放的糖的消耗防止对可以对糖的反馈抑制敏感的任何消化酶的反馈抑制。该 SSF 方法可以在 4-6 的 pH 下在 30°C -60°C 下进行 5 到 7 天，取决于酶用量、所用酶共混物的组成、酶的热稳定性、所用微生物的热和抑制剂耐受性以及发酵中干燥固体的起始浓度。在 40°C 下在高酶 / 高固体（20%）下使用由使纤维素纸浆 218 消化获得的 C6 糖浆进行一种 SSF 振荡烧瓶实验。SSF 振荡烧瓶实验的结果展示在表 15 中，其中在 24 小时内不使具有 20% w/w 干燥固体纤维素纸浆 218 的振荡烧瓶消化到液化点，并且可能不进行取样。

表 15

在 40°C 下的振荡烧瓶同时糖化和发酵

时间	干燥固体	右旋糖	木糖	乳酸	甘油	乙酸	乙醇
小时	%, w/w	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	%, v/v
24	15	4.7	16.8	0.4	14.2	1.6	5.51
24		20			未液化		
48	15	2.0	18.0	0.4	15.0	2.1	6.30
48	20	10.8	21.7	0.4	14.0	1.6	6.58
96	15	4.9	21.7	0.5	16.3	2.4	4.19
96	20	23.1	25.6	0.5	14.8	1.8	5.61
120	15	5.4	24.5	0.6	17.6	2.5	3.11
120	20	28.0	29.7	0.6	16.6	2.0	4.38

[0082] 一种SSF方法的一种变型是一种半SSF方法,其中发酵典型地分阶段但未必用不同原料进行。在一个第一阶段中,使用一种通过可溶半纤维素289和纤维素纸浆218的水解预先制备的C5或C6糖浆作为原料进行一种典型SHF。在此初始期,生物质积聚,制造或不制造所希望的发酵产物。在一个第二阶段,将包含积聚的生物质的发酵介质在水解酶存在下添加到包含半纤维素289或纤维素纸浆218的介质中,以使得所释放的糖的发酵与其由酶的水解释放同时发生。

[0083] 图7示出了两阶段半SSF方法的一种优化方法。在第一阶段,将由可溶半纤维素部分218的酶促水解获得的一个第一部分的富集C5的糖浆用于通过在一个微生物繁殖槽中好氧生长而积聚生物质。在所展示的实施例中,酵母是一种C5胜任乙醇原,如能够由C5糖产生乙醇的酵母菌株424a。然后将繁殖的酵母用于接种馈入有一个第二部分的富含C5的糖浆的发酵介质,并且厌氧地生长一段足够时间,以耗尽糖并且产生第一部分的乙醇。图8是一幅图,展示用于生产乙醇和在实验室振荡烧瓶中一式两份地进行的一个示例性第一阶段期间同时利用C5糖木糖的时程。

[0084] 同时,在用于第二阶段的制备中,将如在此所述的该纤维素纸浆218用一种纤维素分解酶混合物处理一段时间,足以由该纤维素纸浆218部分释放一个第一部分的C6糖。在第二阶段中,将由在上文所提及的富含C5的糖浆上厌氧发酵产生的酵母培养物用于接种包含部分消化的纤维素纸浆和第一部分的C6糖的更大介质。发酵的此第二阶段在厌氧条件下继续一段时间,足以使该纤维素纸浆进一步水解为其他C6糖并且产生乙醇。此方法将产生充足浓度的乙醇(至少8% v/v)以使其对于蒸馏和回收来说是经济的。

[0085] 此类半SSF方法在实验室测试中以两个阶段进行。第一阶段在一个包含50ml经过解毒的C5糖浆的不带有档板的振荡烧瓶中,使用一种通过使木糖发酵酵母424a在由来自玉米秆的半纤维素部分289的酶促消化获得的C5糖浆上发酵获得的发酵液。通过使用以下的组合将C5糖浆处理以移除在预处理期间形成的毒性降解产物,如糠醛、羟基甲基糠醛(HMF)、酚醛树脂、主要由乙酸组成的有机酸以及其他有机物;溶剂萃取,以移除糠醛、

HMF 以及酚醛树脂；使用带电树脂进行离子交换色谱，以移除酸；和/或蒸发，以使挥发性组分分离开。将一种 25% 的接种物用于一种包含 C5 糖浆的一个第二介质，将该第二介质在以 100rpm 旋转的密封烧瓶中在 30℃ 下在厌氧生长条件下培育。在 72 小时之后，将来自此阶段的发酵液用于接种 150ml 的包含玉米秆纤维素纸浆 218 的介质，该介质用一种纤维素分解酶混合物预处理 72 小时。此纤维素分解混合物由 0027 段中描述的酶组成。如表 16 中所示，在 72 小时的 C6 糖浆 / 纸浆发酵之后，一式两份地获得约 8.8% v/v 乙醇的产生，同时利用 98.5% 的可供使用的葡萄糖和约 57% 的可供使用的木糖。

表 16

C5 糖浆和 C6 糖浆的振荡烧瓶半同时糖化和发酵

时间	葡萄糖	木糖			乳酸	甘油	乙酸		乙醇
	g/L	g/L			g/L	g/L	g/L		%, v/v
0	147.0	13.7			0.4	0.3	6.6		
72	2.0	7.3			2.5	7.3	8.0		8.4
72	2.4	8.1			2.0	8.1	8.7		8.8

[0086] 以下的实例用于展示在本披露的某些方面的示例性实践中进行的步骤的目的，并且并不打算限制或示例本发明可以由本领域的普通技术人员实施的所有方式。

实例 1

玉米秆的乙酸 / 乙酸乙酯加工

[0087] 将 1.5kg 具有 92% 固体含量 (1380 克) 和 8% 水分的切短的玉米秆添加到有夹套的旋转反应器中。添加十五个 2.5 英寸 (500g) 陶瓷珠和 7 升 70% 乙酸，并且将反应器封闭。开始反应器旋转并且将流注入夹套。在 10 分钟内，内部反应器温度达到 165℃。保持该温度 2 分钟，并且然后中断蒸汽注射。从夹套缓慢释放蒸汽以历时 3 分钟将反应器的内部温度降低到 150℃。然后使反应器历时 1/2 小时的时间以冷却到 100℃。随后，添加冷却水以使反应器温度达到 60℃，并且打开反应器。将煮过的秆经一个布氏漏斗 (Buchner funnel) 过滤，并且加压。收集五升的乙酸水解产物滤液。将被升温到 50℃ 的温度的五升 99% 乙酸用于将残余木质素和半纤维素由滤饼溶解并且洗涤，并且分开地收集。添加四升乙酸乙酯以洗涤乙酸的滤饼，并且过滤洗液以获得乙酸乙酯滤液和滤饼。将滤饼由漏斗移出，抖松，并且空气干燥，形成样品 A (810 克)。

[0088] 将乙酸第一滤液蒸发到 1.2 升。将第二乙酸滤液添加到第一滤液中，并且再次蒸发，达到 1.2 升的最终体积。将乙酸乙酯滤液添加到经过蒸发的水解产物混合物中，并且将此蒸发为约 800ml 的糖浆。将此温糖浆添加到 2 升乙酸乙酯中，以使半纤维素和木质素沉淀出 (样品 B, 475 克)。将滤液浓缩为重糖浆，并且添加 600ml 乙酸乙酯，以使另 50 克的物质沉淀 (样品 C)。将残余滤液蒸发成包含 210 克溶解固体的重糖浆 (样品 D)。将十克样品 B 分散并且放置到 65ml 热水中，以使水溶性部分溶解，然后过滤并且保留滤液 (样品 E)。

[0089] 将这些样品针对溶解固体、水解糖形式、金属、N、P 及 K 以及乙酸进行分析。除非

另外指明, 否则下表概述了以 g/Kg 为单位报道的不同分析的结果。

表 17

样品 A 的溶解固体

样品号 A	葡聚糖	木聚糖	甘露聚糖	半乳聚糖	ASH
原样的纸浆	530.3	106.8	6.9	22.7	96.4
纸浆干基	532.4	107.2	6.9	22.7	96.7

酸不溶性木质素	酸可溶木质素	游离右旋糖	游离木糖	结合乙酸酯	游离乙酸酯*	干燥固体*
39.8	12.1	0.3	0.7	29.7	15.4	996.2
39.9	12.2	0.3	0.7	29.8		

表 18

样品 B-D 的无机元素

样品名称	Al	P	S	Zn	Co	Ni	Fe	Cr	Mg
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
B	123	4220	1970	69.1	1.25	3.74	1330	28.5	6700
C	14.8	556	1040	35.0	0.358	1.28	171	8.87	1120
D	0.289	94.0	297	4.12	nd	nd	2.58	0.604	38.0

Ca	Cu	Na	K	Mn	Mo	B	N	Ash
mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%	%
5720	13.6	43.9	44800	159	0.907	16.8	1.63	8.9%
1590	25.5	52.2	43500	24.8	0.586	6.27	1.65	9.1%
147	4.96	29.1	18600	1.12	nd	0.604	0.411	3.6%

表 19

样品 B-D 糖分析

样品信息	C5 糖 (原样) mg/kg	C6 糖 (原样) mg/kg	C5 糖 (经过水解的) mg/kg	C6 糖 (经过水解的) mg/kg	酸不溶物* %
样品 B: 木质素/半纤维素沉淀物 1	42,215	36,109	354,960	99,387	25.8 (2.61% N; 4.6% 灰分)
样品 C: 木质素/半纤维素沉淀物 2	57,034	34,067	249,980	72,546	45.5 (1.59% N; 2.2% 灰分)
样品 D: 残余糖浆 (49.75% DS)	18,355	11,450	41,235	11,457	32.7** (0.59% N; 6.3% 灰分)

表 20
样品 B-D 杂项分析

灰分 %	硫 g/kg	钾 g/kg	其他金属 g/kg	氮 %	乙酸 g/kg	乙酸乙酯 g/kg	HMF+ AcMF g/kg	糠醛* g/kg
8.91 (1.14 酸不溶物)	1.97	44.80	18.43	1.63	76.8	NA	1.68	0.34
9.14 (1.00 酸不溶物)	1.04	43.50	3.61	1.65	55.8	NA	9.43	0.29
3.63 (2.06 酸不溶物)	0.30	18.60	0.32	0.41	301.7	181.5	20.18	6.98

*HMF = 羟甲基糠醛, AcMF = 乙酰氧基甲基糠醛 (HMF 的乙酸酯)

表 21

样品 E 中的糖、木质素、乙酸以及元素

样品信息*	D.S.	C5 糖 (原样)	C6 糖 (原样)	C5 糖 (经过水解的)	C6 糖 (经过水解的)	灰分	S	K	其他金属	N	乙酸	可溶性木质素
	%	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%	g/kg	g/kg	g/kg	%	g/kg	g/kg
样品 E-水性部分	11.4	6,919	5,763	43,360	12,204	1.2	0.2	5.7	7.9	0.2	12.2	2.8

实例 2

经过乙酸 / 乙酸乙酯处理的玉米秆的液体 / 液体分离

[0090] 切短的玉米秆与 70% 乙酸接触, 加热, 并且实质上如实例 1 中概述进行过滤。通过蒸发到 40% 溶解固体来浓缩滤液, 形成浓缩的半纤维素和木质素水相。浓缩的半纤维素和木质素水相 (1250ml) 与一个第一量的乙酸乙酯 (1250ml) 接触, 将其小心地调节以防止形成沉淀物和引起相分离, 并且混合。将混合物容易地分离成两个相: 下部相包含胶质重水相, 其包含大部分的糖和有机不溶性木质素 (约一半的木质素) 并且乙酸含量降低。上层相包含有机上清液相, 它包含有机可溶性木质素、乙酸盐、乙酸乙酯以及乙酸。在倾析有机上清液相之后, 重水相的体积是约 500ml。重水相与乙酸乙酯 (500ml) 接触 (洗涤) 并且在 50°C 下混合。将更多的乙酸再次分隔到乙酸乙酯相中, 引起包含糖和木质素的重水相中乙酸量的进一步降低。再次分离混合物, 在重水相上方形成第二有机上清液; 倾析第二上清液。乙酸乙酯 (500ml) 再次与重水相接触同时在 50°C 下混合。再次分离混合物, 形成一个第一相, 它包含经过洗涤的重水相和一个第三有机上清液。在倾析第三有机上清液之后, 组合并且混合有机上清液, 形成包含有机上清液的一个第二相; 形成少量焦油状沉淀物并且分离和添加到经过洗涤的重水相中。

[0091] 经过洗涤的重水相与足以引起木质素沉淀的水 (1250ml) 接触, 由此形成疏松的有机不溶性木质素的沉淀物。将混合物加热到 94°C 同时混合, 由此使疏松的沉淀的木质素凝结。使混合物在混合下冷却到 50°C, 并且接着过滤。在过滤之后, 获得木质素滤饼; 木质素滤饼用 400ml 水洗涤并且干燥以产生有机不溶性木质素 (100 克干燥固体)。包含富含半纤维素 / 糖的部分的滤液 (样品 F, 1650mL, 表 22) 仅包含 6.1% 乙酸。

表 22

样品 F 中的干燥固体、糖、木质素、乙酸以及元素。“原样”表示无糖; “经过水解的”表示在分析性水解之后回收糖。

样品信息	干燥固体 %	C5 糖 (原样) mg/kg	C6 糖 (原样) mg/kg	C5 糖 (经过水解的) mg/kg	C6 糖 (经过水解的) mg/kg	总灰分 %	S g/kg	K g/kg	其他金属 g/kg	乙酸 g/kg
富含半纤维素/糖的部分 F	16.5	15,081	5,777	78,642	20,202	1.60	0.17	6.16	4.08	61.1

[0092] 用硫酸将富含半纤维素 / 糖的部分的子样品酸化到 pH 2.8 并且与相同体积的乙酸乙酯接触。乙酸乙酯萃取容易地移除少量剩余的乙酸, 因为形成两个液体相并且在无乳液形成的情况下容易地分离。形成包含耗乏乙酸的 C5+C6 糖的第三相 (包含 36.9g/kg 乙酸) 并且容易地移除。用乙酸乙酯再次萃取耗乏乙酸的 C5+C6 糖, 将乙酸含量进一步降低到 23.3g/kg。可以将两个乙酸乙酯部分合并以形成包含回收的乙酸的有机第四相。耗乏乙酸的 C5+C6 糖相富含 C5 和 C6 糖并且由于低乙酸含量而适用于发酵。

[0093] 包含有机上清液的第二相经历蒸发以回收乙酸乙酯并且乙酸与水性上清液糖浆 (0.4 份, 表 23 和 24, 样品 G) 分离。水性上清液糖浆富含有机可溶性木质素和乙酸盐并且乙酸乙酯和乙酸的含量降低。水性上清液糖浆与相同体积的水接触以形成包含富含乙酸盐的水性第五相和富含有机可溶性木质素的第六相的两相混合物。将两相混合物加热到 90°C 同时搅拌以使乙酸乙酯蒸发并且将水溶性组分 (如乙酸盐) 萃取到水性第五相中。在冷却到 40°C 后, 移出水性第五相。再重复第六相的水洗涤两次。将经过水洗涤的有机第六相冷却, 研磨并且干燥以产生有机可溶性木质素粉末 (135 克)。将水性第五相与洗涤水组合并且蒸发成乙酸盐水溶液 (144 克)。可将此水相干燥并且用于肥料。

[0094] 通过以此方式进行液体 / 液体分离, 将切短的玉米秆部分分离成耗乏乙酸的 C5+C6 糖、有机可溶性木质素、有机不溶性木质素以及乙酸盐水溶液。另外, 防止乳液形成, 使用体积实质上降低的乙酸乙酯, 并且易于回收乙酸乙酯和乙酸两者。

实例 3

经过乙酸 / 乙酸乙酯处理的玉米秆的液体 / 液体分离

[0095] 实质上如在实例 1 中所概述, 玉米秆 (1500 克, 92% 干燥固体) 与 7.5 升约 70% 乙酸溶液一起在旋转反应器中在 163°C -171°C 下水解 10 分钟。反应器在 30 分钟时段内冷却到 121°C, 并且在 10 分钟时段内用冷却水冷却到 60°C。向煮过的秆加压并且过滤以回收与乙酰化木质纤维素滤饼分开的第一水解产物。通过使乙酰化木质纤维素滤饼与一升 70% 乙酸在 60°C 接触三次来使乙酰化木质纤维素滤饼与第二量的乙酸接触, 并且过滤以产生经过酸洗涤的酰化木质纤维素饼 (约 1.5 升体积) 和约 8 升酸洗液。经过酸洗涤的乙酰基纤维素滤饼与一升乙酸乙酯接触两次并且过滤以回收与经过乙酸乙酯洗涤的乙酰基纤维素纸浆 (约 1.5 升) 分开的约 3 升乙酸乙酯洗涤物。将乙酸乙酯洗液与第一酸水解产物组合以形成包含组合的乙酸可溶物的酸性有机溶剂萃取物。通过将包含组合的乙酸可溶物的酸性有机溶剂萃取物蒸发到 1.3 升来从其回收乙酸, 形成富含半纤维素和木质素的浓缩的半纤

纤维素和木质素水相（蒸发（浓缩））。此与来自经过酸洗涤的乙酰基纤维素的乙酸乙酯洗液组合，并且通过蒸发到 1 升体积使乙酸乙酯浓缩，形成富含半纤维素和木质素的浓缩的半纤维素和木质素水相（表 23-25，样品 H，密度 1.25g/ml）。浓缩的半纤维素和木质素水相（样品 H）包含 37% 乙酸和 52.9% 干燥固体。在多糖的水解之后获得分别包含 5.39% C5 糖、0.76% C6 糖以及 15.5% 和 4.2% C5 和 C6 糖的干燥固体；这与初始水解处理中半纤维素的 23.8% 水解程度对应。

[0096] 为了通过液体 / 液体分离实现浓缩的半纤维素和木质素水相的分离，一个第二量的乙酸乙酯与浓缩的半纤维素和木质素水相接触。选择这一量的乙酸乙酯（1.5 升乙酸乙酯添加到一升浓缩的半纤维素和木质素中）以引起相分离和防止形成沉淀物。使混合物分离成经过洗涤的重水相，其包含大部分的 C5 糖和 C6 糖以及有机可溶性木质素（表 23-25，样品 I，61.6% 干燥固体，700ml），和一个第二相，它包含有机上清液，这些有机上清液包含有机可溶性木质素、乙酸盐、乙酸乙酯以及乙酸（表 23-24，样品 J，12.3% 干燥固体，1780ml）。

[0097] 重水相（400ml，表 23-25，样品 I）与水（800ml，室温水）接触并且搅拌。在沉淀 45 分钟之后，观测到透明的棕色溶液（约 1200ml）和沉淀物（200ml）。倾析上层相（经过水洗涤的富含 C5 糖和 C6 糖的重水相）并且用 300ml 水萃取沉淀物并且过滤以产生有机不溶性木质素的滤饼。将滤液添加到富含 C5 糖和 C6 糖的经过水洗涤的重水相中以形成 C5+C6 糖浆（半纤维素流，1650ml，9.7% 干燥固体，表 23-25，样品 K）。

[0098] 通过蒸发使上清液 J 缩合以产生乙酸乙酯和乙酸的缩合物并且形成水性上清液糖浆（300ml）。水性上清液糖浆保持在 70°C 下并且与相同体积的 70°C 水接触（搅拌）以形成两相混合物。在无加热到 90°C 的步骤下将此混合物冷却到 40°C。倾析上部水相并且用 300ml 热水洗涤下部有机相两次。收集包含有机可溶性木质素的经过水洗涤的有机相并且冷却和固化（295 克）。组合水相以产生乙酸盐的溶液（1000ml，4.3% 干燥固体，表 23-25，样品 L）。关于样品 G-L 的组成信息提供于表 23-25 中。

[0099] 通过以此方式进行液体 / 液体分离，将切短的玉米秆部分分离成富含 C5 糖和 C6 糖并且乙酸含量降低的经过水洗涤的重水相、有机不溶性木质素、有机可溶性木质素、乙酸盐溶液以及回收的乙酸乙酯和乙酸的溶液。另外，防止乳液形成，避免使用硫酸，并且使用体积实质上降低的乙酸乙酯。

表 23
糖分析样品 G-L

样品	干燥固体 %	C5 糖 (原 样) %	C6 糖 (原 样) %	C5 糖 (经过水解的) %	C6 糖 (经过水解的) %
G	7.0	0.83	0.19	2.00	0.53
H (268)	52.9	5.39	0.76	15.46	4.24
I (312)	61.6	8.35	1.17	22.07	6.62
J (316)	12.3	0.70	0.09	0.54	0.07
K (352)	9.7	1.77	0.27	5.01	1.06
L	NA	1.00	0.10	NA	NA

表 24

样品 G-L 的杂项分析

样品信息	总灰分 %	硫 g/kg	钾 g/kg	其他金属 g/kg	乙酸 %	乙酸乙酯 %	HMF %	糠醛 %
G	NA	NA	NA	NA	57.1	0.20	0.04	1.03
H	0.00	0.50	0.00	0.00	36.6	0.60	NA	NA
I	0.00	0.55	0.00	0.00	15.7	11.20	NA	NA
J	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K	0.00	0.09	0.00	0.00	4.1	2.70	NA	NA
L	0.00	0.03	0.00	0.00	6.1	0.70	0.17	0.08

表 25

样品 H、I、K 以及 L 的无机元素和灰分

样品	Al	P	S	Zn	Co	Ni	Fe
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
H	91.6	863	503	34.1	0.258	1.72	300
I	152	1272	550	33.2	0.322	1.78	467
K	40.2	397	90.0	11.7	ND	0.640	110
L	0.414	14.3	32.5	6.23	ND	ND	2.42

样品	Cr	Mg	Ca	Cu	Na	K	Mn	Mo	B	灰分
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%

H	1.96	1371	2581	1.41	8.34	13877	65.1	ND	4.59	8.0
I	1.76	1840	3463	1.51	6.48	19575	91.4	ND	5.55	2.5
K	ND	618	1046	ND	11.0	4547	29.4	ND	6.61	1.0
L	ND	53.2	171	ND	19.8	2535	2.57	ND	6.82	0.4

所选择的参考文献：

K. P. 沃 格 尔 (K. P. Vogel), J. F. 佩 德 森 (J. F. Pederson), S. D. 麦 斯 特 森 (S. D. Masterson), J. J. 特 洛 伊 (J. J. Troy). 用于 NDF、ADF 以及 IVDMD 饲料分析的过滤袋系统的评估 (Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF and IVDMD forage analysis). 《作物科学》(Crop Scie.) 39, 276-279 (1999)。

J. B. 斯 勒 伊 特 (J. B. Sluiter), R. O. 鲁 兹 (R. O. Ruiz), C. J. 斯 卡 拉 塔 (C. J. Scarlata), A. D. 斯 勒 伊 特 (A. D. Sluiter), D. W. 邓 普 顿 (D. W. Templeton). 木质纤维素原料的组成分析 1. 综述与方法描述 (Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods). 《农业与食品化学杂志》(J. Agric. Food Chem.) 58, 9043-9053 (2010)。

M. 赛 德 拉 克 (M. Sedlak), H. J. 爱 登 博 格 (H. J. Edenberg), N. W. Y 霍 (N. W. Y Ho). 在由经过代谢工程改造的酵母菌属宿主进行的葡萄糖与木糖共同发酵期间产生乙醇的主要酶的编码基因的表现的 DNA 微阵列分析 (DNA microarray analysis of the expression of the genes encoding the major enzymes in ethanol production during glucose and xylose co-fermentation by metabolically engineered Saccharomyces host). 《酶与微生物技术》(Enz. Microbial Technol.) 33, 19-28 (2003)。

S. C. 贝 特 (S. C. Bate), W. A. 罗 杰 森 (W. A. Rogerson), F. G. 皮 奇 (F. G. Peach) 1953. 在纤维素与纤维素衍生物制造方面的改良 (Improvements in the production of cellulose and cellulose derivatives). 英国专利 686311。

P. P. 罗 苏 (P. P. Rousu), J. R. 安 蒂 拉 (J. R. Antilla), E. J. 罗 苏 (E. J. Rousu) 2001. 用于回收甲酸的方法 (Method for the recovery of formic acid). 美国专利 6252109。

J. C. 帕 拉 约 (J. C. Parajo), J. L. 阿 隆 索 (J. L. Alonso), D. 瓦 茨 奎 兹 (D. Vazquez). 在原木的乙酸制浆加工期间木质素和半纤维素的性质 (On the behaviour of lignin and hemicelluloses during the Acetosolv processing of wood). 《生物资源技术》(Bioresource Technology) 46, 233-240 (1993)。

S. 阿 巴 德 (S. Abad), J. L. 阿 隆 索 (J. L. Alonso), V. 桑 托 (V. Santo), J. C. 帕 拉 约 (J. C. Parajo). 来自经过催化的乙酸介质中的原木的糠醛:数学评估 (Furfural from wood in catalyzed acetic acid media:mathematical assessment). 《生物资源技术》(Bioresource Technology) 62, 115-122 (1997)。

C. 维 拉 (C. Vila), V. 桑 托 斯 (V. Santos), J. C. 帕 拉 约 (J. C. Parajo). 从乙酸-水-HCl 制浆液体回收木质素和糠醛 (Recovery of lignin and furfural

from acetic acid-water-HCl pulping liquors). 《生物资源技术》(Bioresource Technology)90, 339-344(2003)。

M.-F. 李 (M.-F.Li), S.-N. 孙 (S.-N.Sun), F. 许 (F.Xu), R.-C. 孙 (R.-C.Sun). 用于附加值应用的异质性竹子有机溶剂木质素的连续溶剂部分分离 (Sequential solvent fractionation of heterogeneous bamboo organosolv lignin for value-added application). 《分离和纯化技术》(Separation and Purification Technology)101, 18-25(2012)。

S. 克罗姆 (S.Korom), Z. 冯约伊 (Z.Fonyoi) 以及 O.M. 卡特 (O.M.Kut). 用于乙酸回收的设计策略 (Design strategy for acetic acid recovery). 《化学工程通信》(Chem. Eng. Comm.)136, 161-176(1995)。

C. 维拉 (C.Vila), V. 桑托斯 (V.Santos), J.C. 帕拉约 (J.C.Parajo). 有机溶剂制浆法的模拟:一般性材料平衡和设计计算 (Simulation of an organosolv pulping process:generalized material balances and design calculations). 《工业与工程化学研究》(Ind. Eng. Chem. Res.)42, 349-356(2003)。

P. 柏丽 (P.Biely). 使植物多糖去乙酰化的微生物碳水化合物酯酶 (Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides). 《生物技术进展》(Biotechnol. Adv). 30(6), 1575-1588(2102)。

Z. 祖 (Z.Zu), A. 阿法坎 (A.Afacan), K. 常 (K.Chang). 通过催化蒸馏从水移出乙酸. 第2部分:模型化和仿真研究 (Removal of acetic acid from water by catalytic distillation. Part 2:Modeling and simulation studies). 《加拿大化学工程学报》(Can. J. Chem. Eng.)77682-687(1999)。

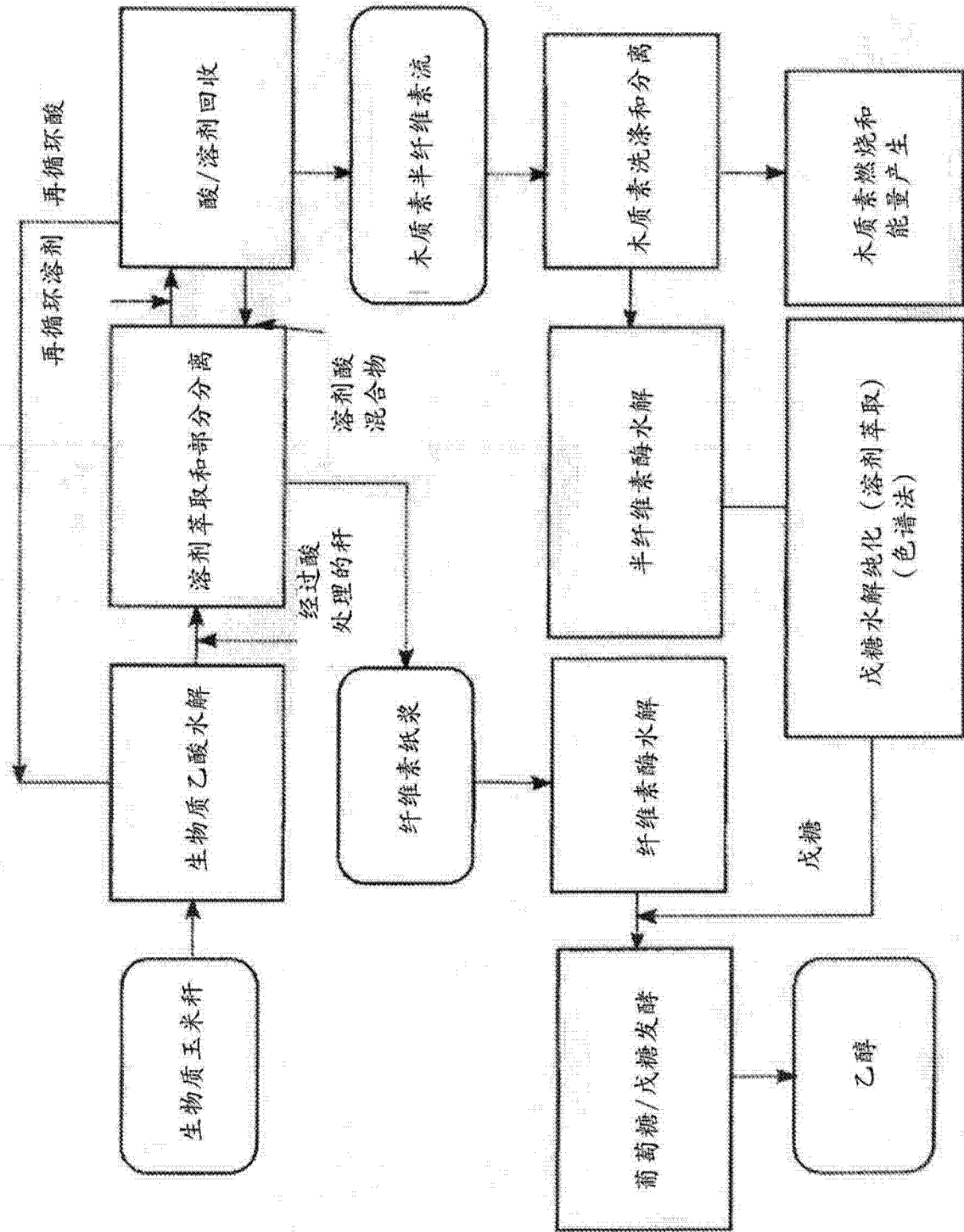


图 1

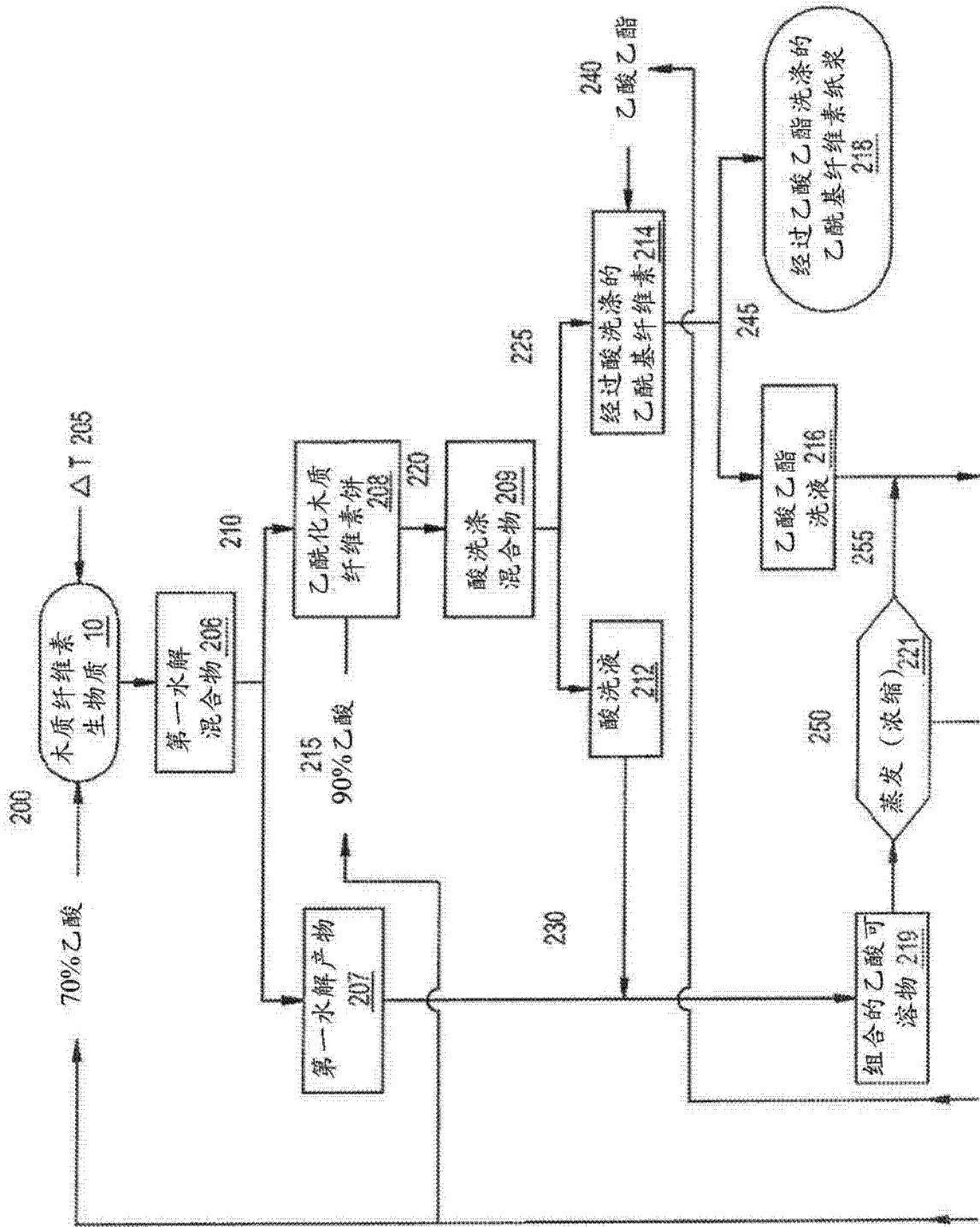


图 2A

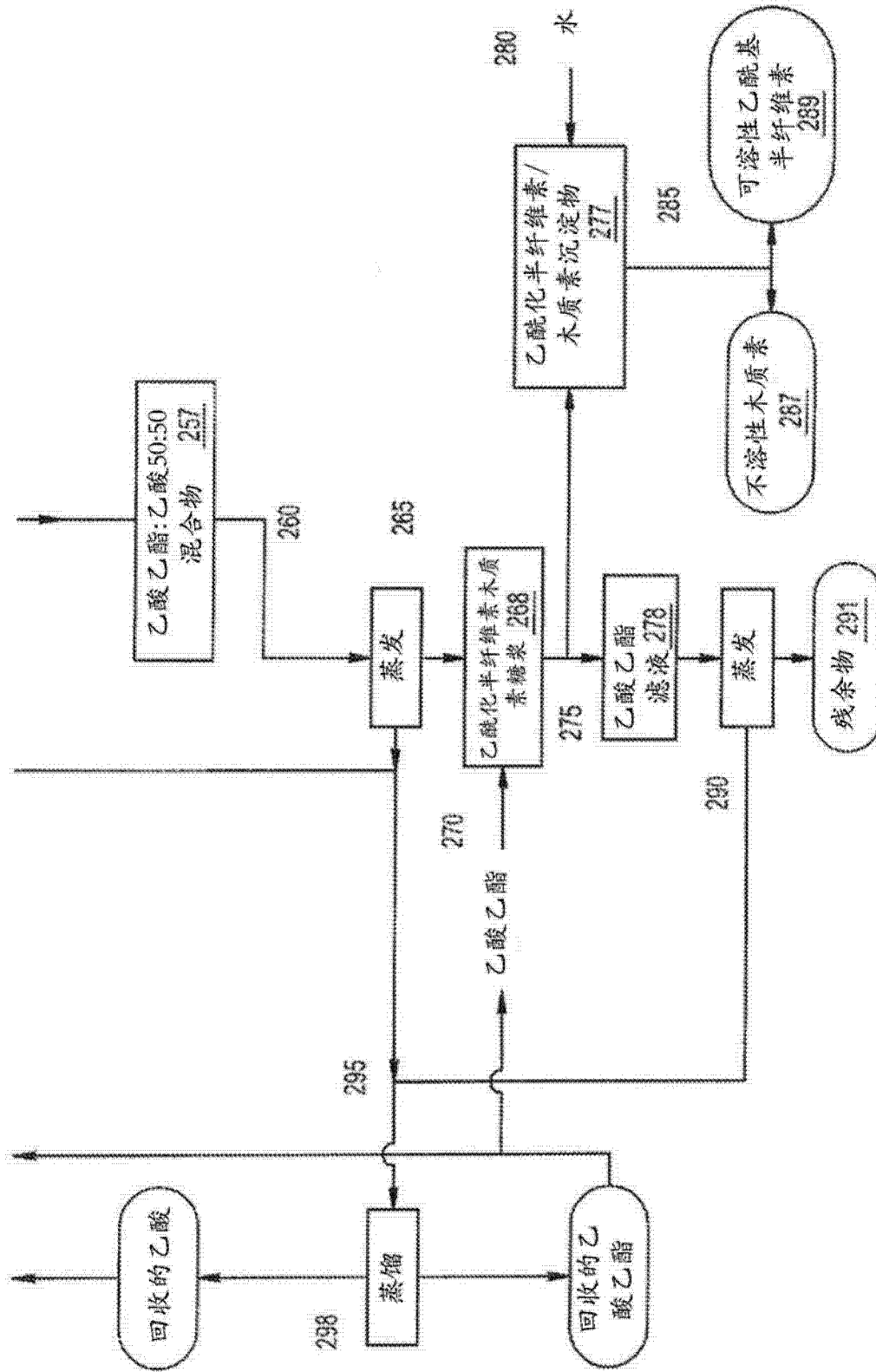


图 2B

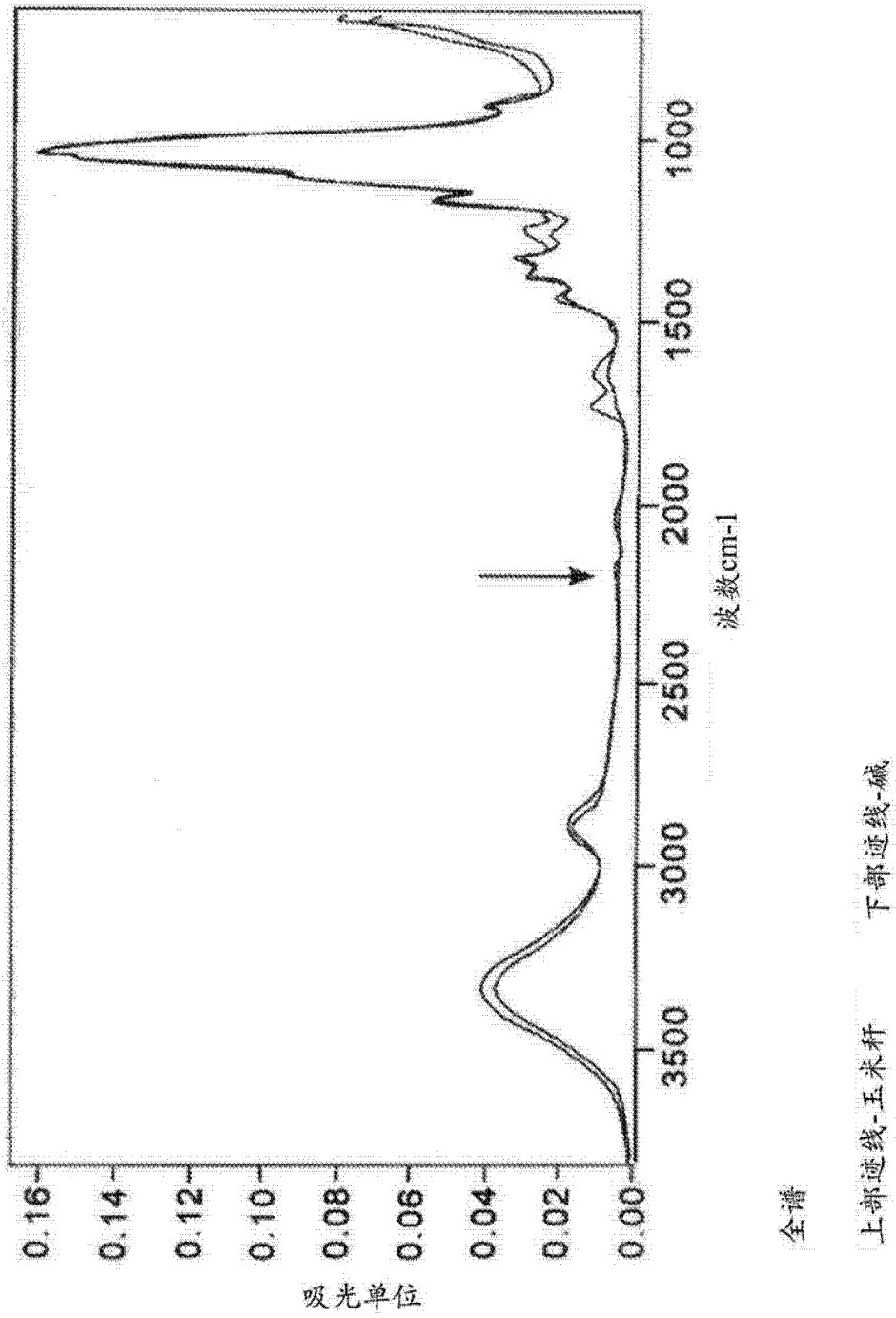


图 3

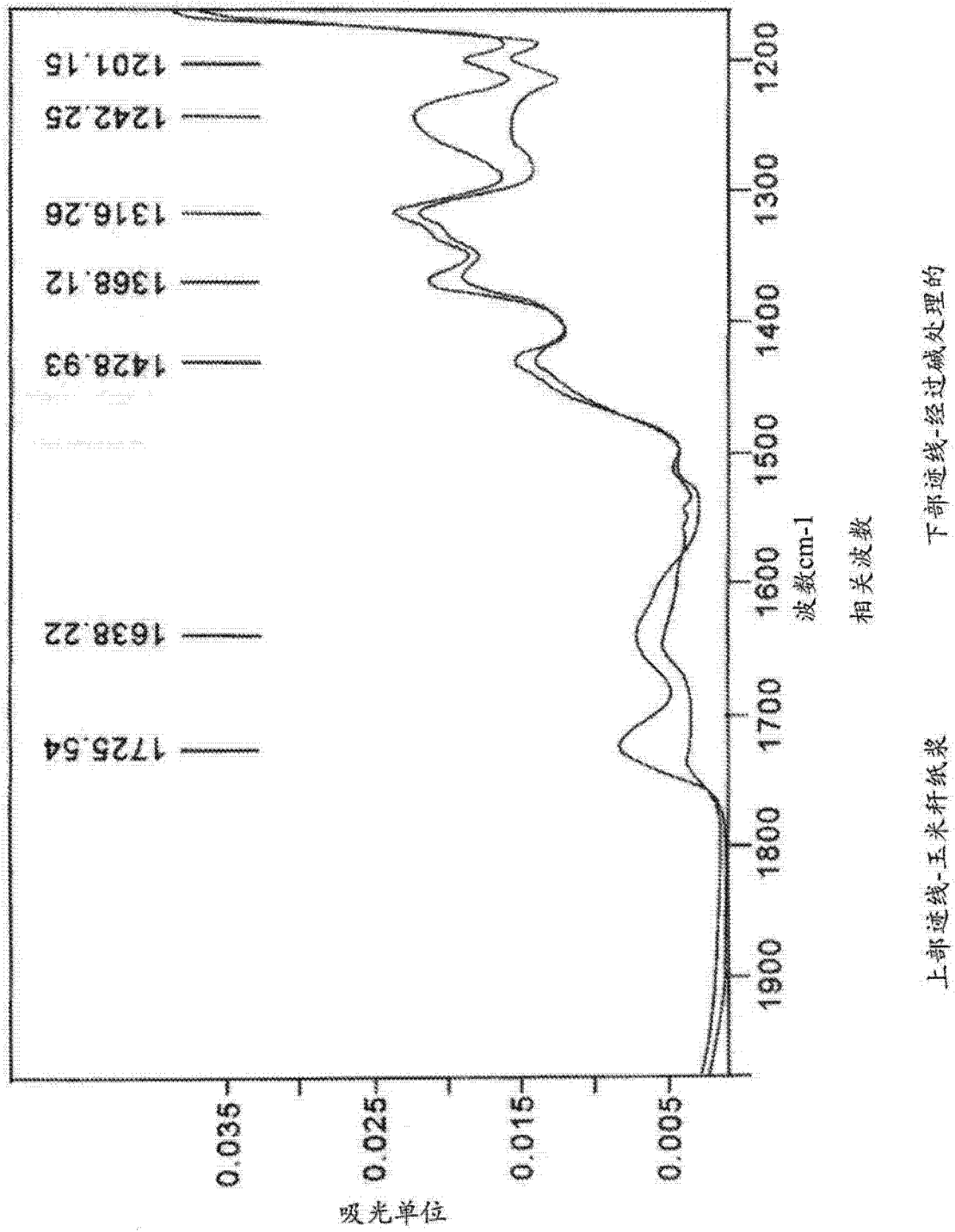


图 4

由秆纸浆释放的葡萄糖

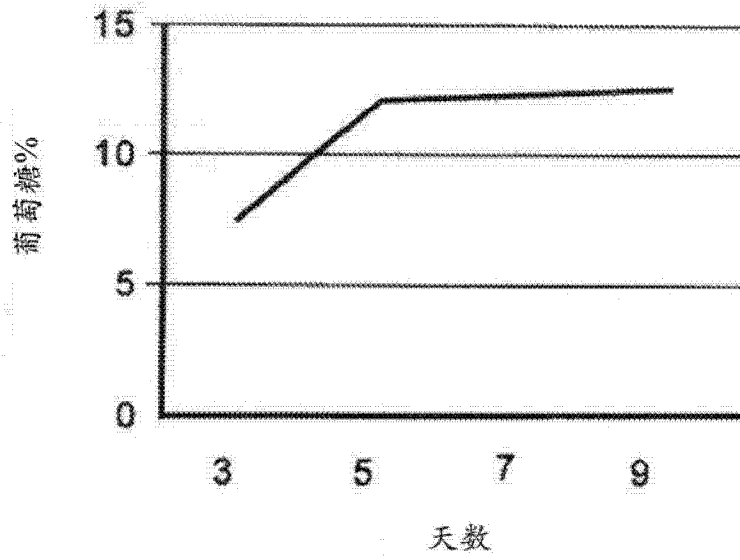


图 5

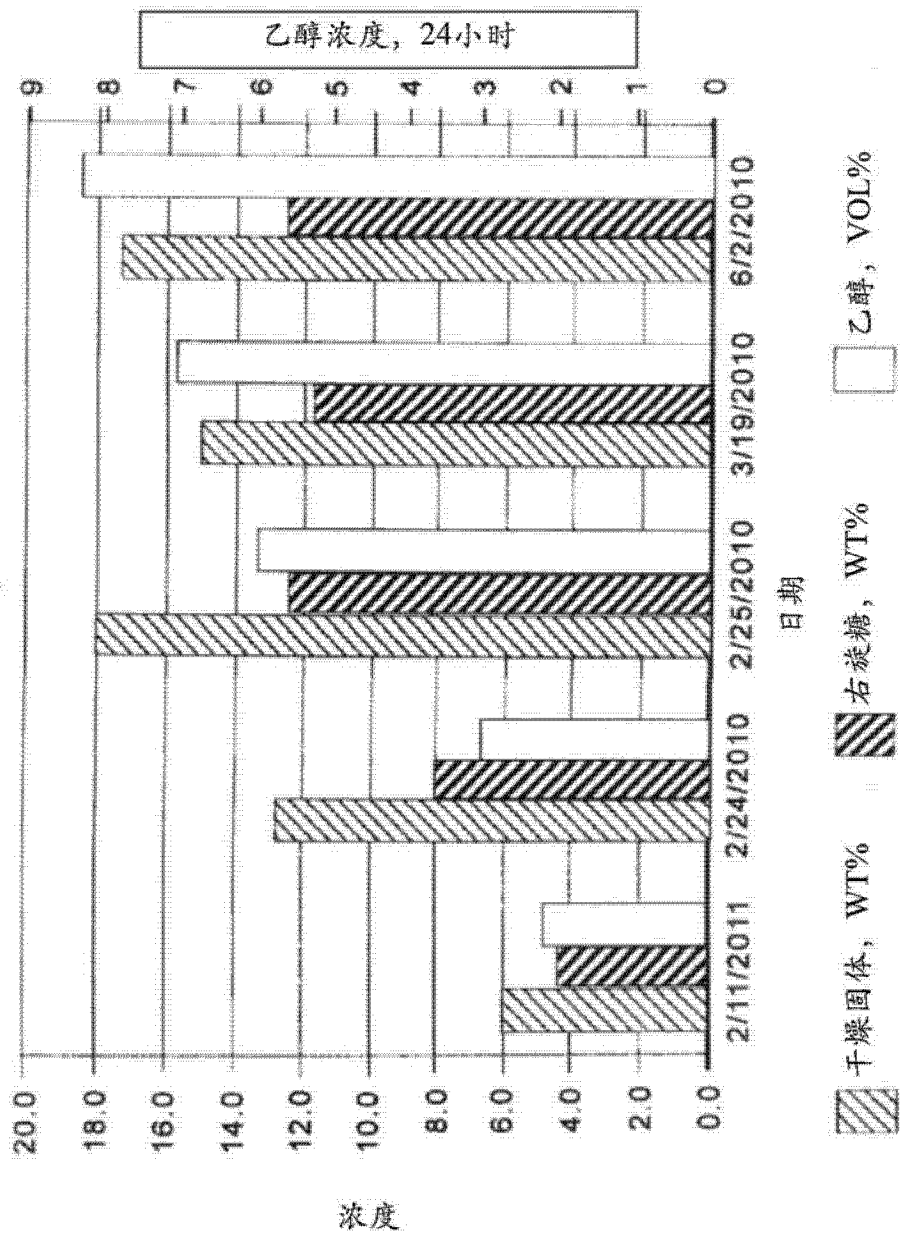


图 6

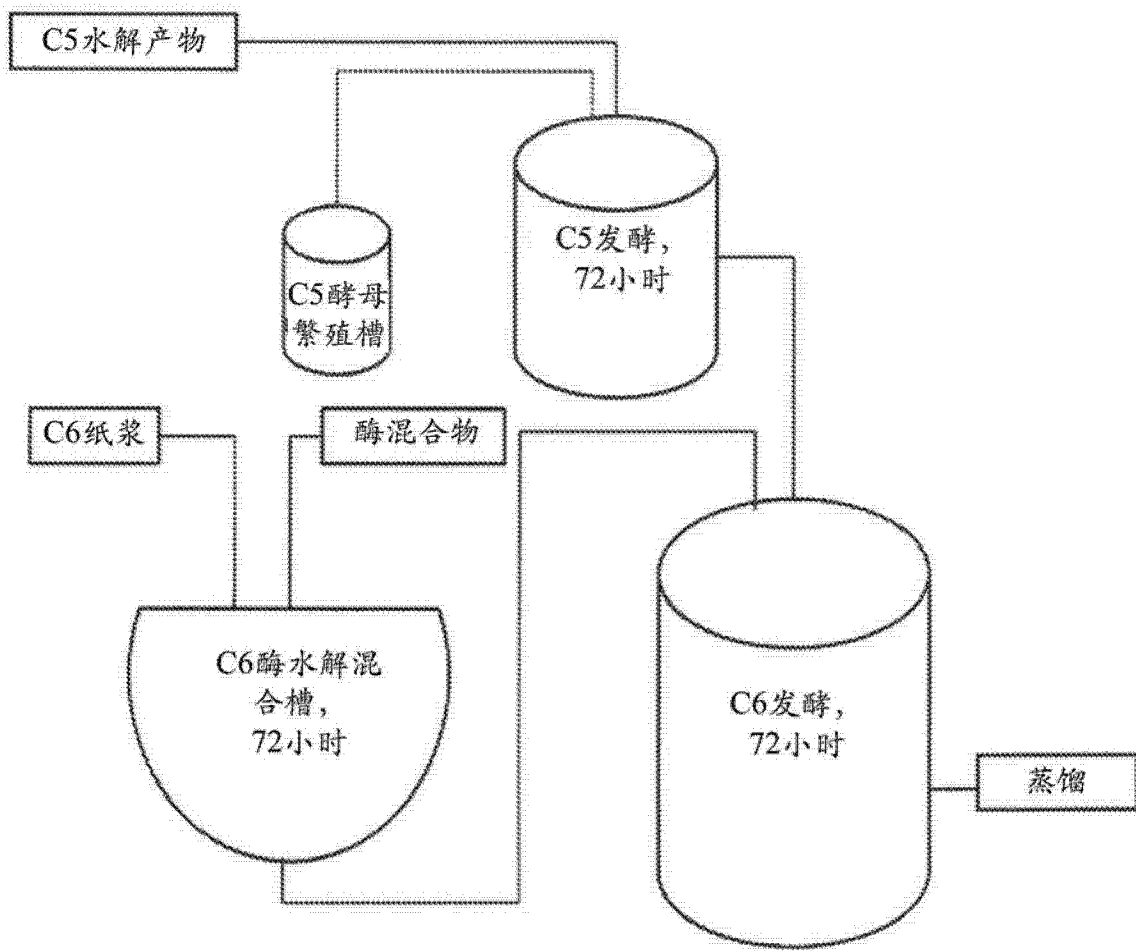


图 7

022211IBR C5流中通过424a的随时间推移的
乙醇产生和木糖使用 (g/L) , 100%材料

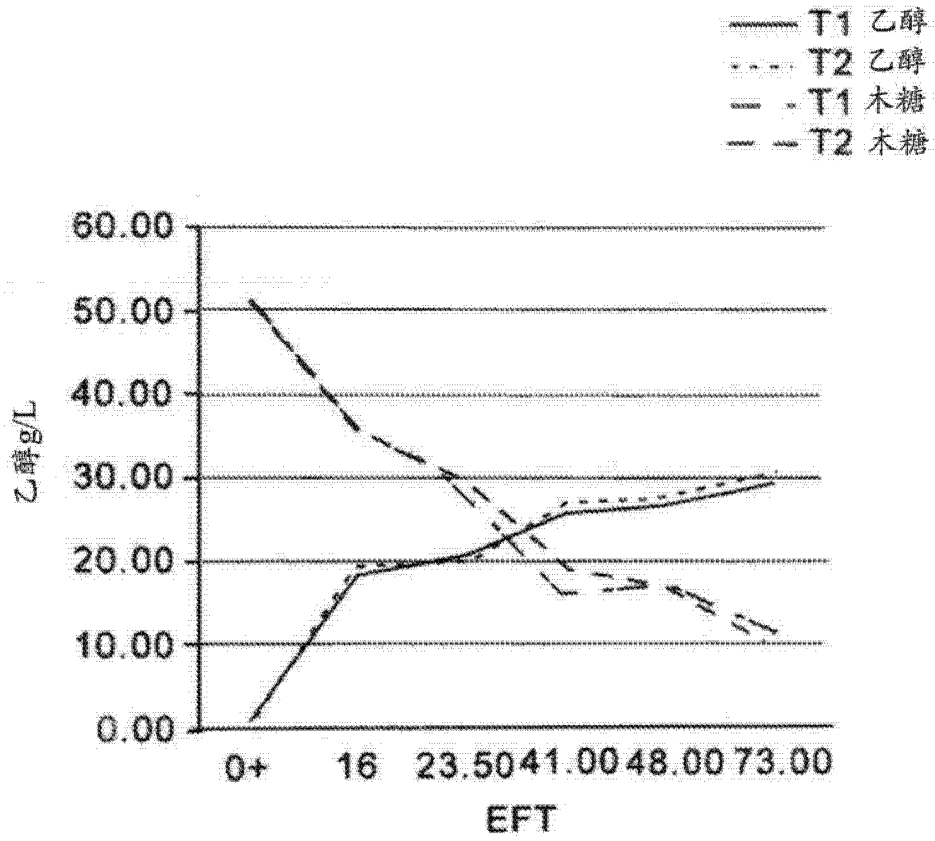


图 8

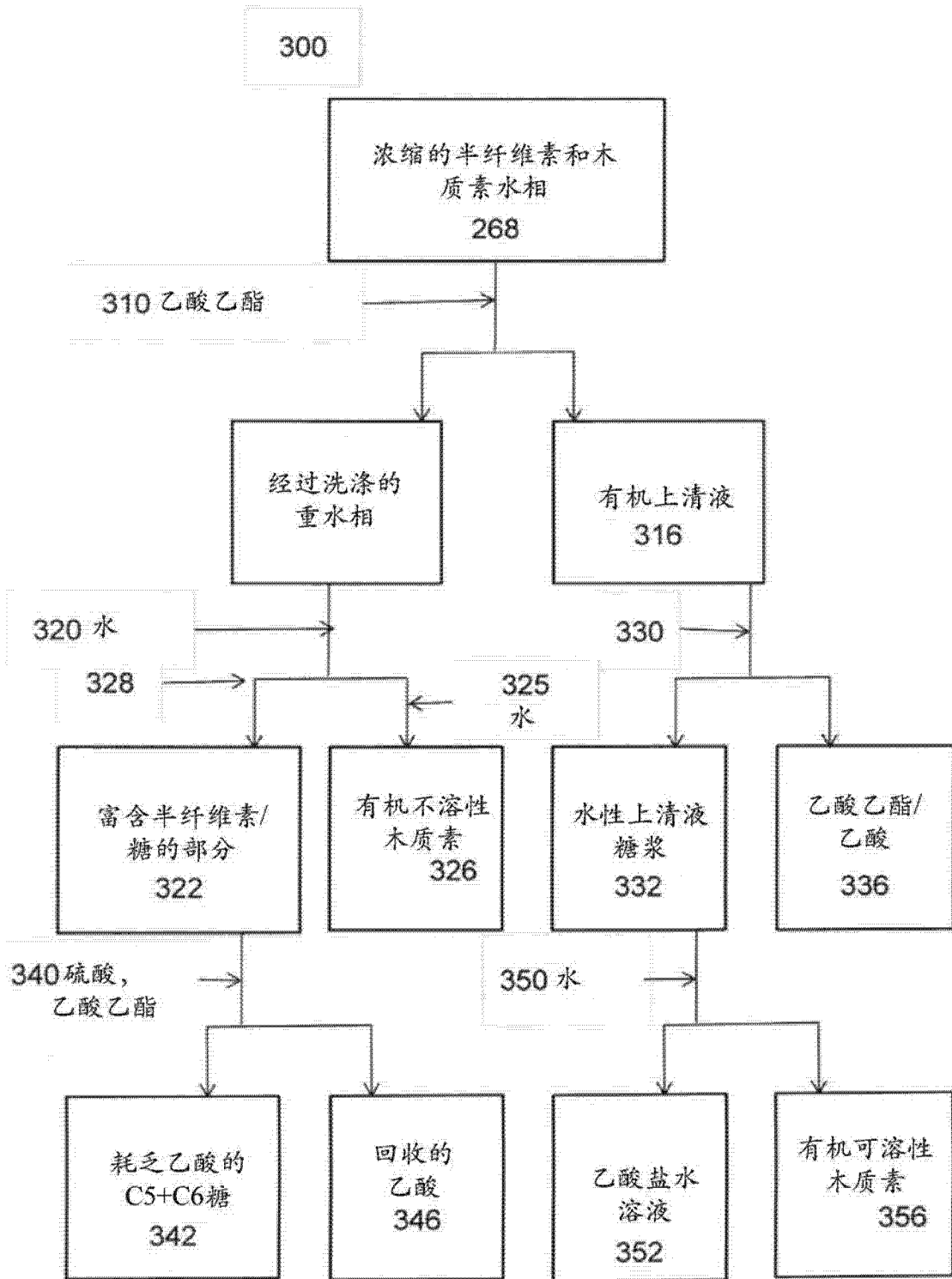


图 9