

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C02F 11/08

C02F 3/34 C12P 7/10



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01808115.0

[45] 授权公告日 2005 年 2 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1190373C

[22] 申请日 2001.2.19 [21] 申请号 01808115.0

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 17 [33] DK [31] PA200000256

[32] 2000. 3. 15 [33] DK [31] PA200000427

[86] 国际申请 PCT/DK2001/000114 2001. 2. 19

[87] 国际公布 WO2001/060752 英 2001. 8. 23

[85] 进入国家阶段日期 2002. 10. 15

[71] 专利权人 里索国家实验室

地址 丹麦罗斯基勒

共同专利权人 伯吉特·凯尔·阿灵

[72] 发明人 B·K·阿灵 A·B·汤姆森

审查员 刘长青

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李华英

权利要求书 3 页 说明书 45 页 附图 4 页

[54] 发明名称 处理木质纤维素材料的方法

[57] 摘要

这是一个将木质纤维素生物物质转化成可燃燃料产品的方法。具体的说，该发明提供了一个连续的包括湿法氧化或者蒸汽爆炸在内的发酵转换过程，即通过这一过程把生物物质转化为乙醇，并使全部或部分乙醇发酵的工艺废水得到回用，从而在很大程度上减少了工艺水的消耗。将乙醇发酵的废水厌氧发酵生产甲烷，并使处理后的废水中的潜在的抑制性物质的含量降低到一个很低的水平，从而使经过厌氧发酵处理的废水可以全部或者部分地回用到生产工艺中去。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、连续地将固体木质纤维素生物物质材料转化成乙醇的工艺方法，它包括以下几个步骤：

(I) 提供生物物质材料的含水液浆；

(II) 将所述含水液浆在反应器中提升温度和 / 或增加氧气含量，使液浆中的生物物质材料至少部分分离成为纤维素、半纤维素以及木质素；

(III) 将从步骤 (II) 中得到的液浆和 / 或其水相进行处理，使其中纤维素和半纤维素至少部分水解，以获得含有一定量微生物发酵糖的液浆和 / 或水相，这样得到的液浆和 / 或水相可以用来作为乙醇发酵介质；

(IV) 将从步骤 (III) 中得到的液浆和 / 或水相进行至少一次乙醇发酵步骤；

(V) 把乙醇与步骤 (IV) 中的发酵介质进行分离，便产生包含抑制水平以下的抑制物质的发酵废水排放液；

(VI) 将所述废水排放液进行生物处理，由此将抑制物质的水平降低到抑制水平以下；

(VII) 把全部或部分如此处理过的废水排放液引入前面从步骤 (II) 到步骤 (V) 中的任何一步；和

(VIII) 连续重复步骤 (I) 到 (VII) 。

2、权利要求 1 所述的方法，其中，步骤 (VI) 的处理过程是一个厌氧发酵过程。

3、权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，步骤 (VI) 的处理过程是由产甲烷微生物完成的。

4、权利要求 3 所述的方法，其中所述产生甲烷的微生物选自甲烷杆菌属、甲烷短杆菌属、甲烷嗜热菌属、甲烷球菌属、甲烷微菌属、产甲烷菌属、甲烷螺菌属、甲烷盘菌属、甲烷球形菌属、甲烷八叠球菌属、甲烷叶菌属、甲烷袋状菌属、甲烷丝菌属、鬃毛甲烷菌属、甲

烷嗜高热菌属 及甲烷粒菌属。

5、权利要求 2 所述的方法，其中步骤 (VI) 的处理过程是由产乙酸微生物完成的。

6、权利要求 1 所述的方法，其中在步骤 (II) 中含水液浆处于碱性条件。

7、权利要求 1 所述的方法，其中在步骤 (III) 的部分水解中使用糖酶。

8、权利要求 7 所述的方法，其中所述糖酶选自纤维素酶；包括葡聚糖-1,3- β -葡糖苷酶（外-1,3- β -葡聚糖酶）及内-1,3(4)- β -葡聚糖酶在内的 β -葡聚糖酶；包括内-1,4- β -木聚糖酶在内的木聚糖酶；以及果胶酶。

9、权利要求 1 所述的方法，其中，从步骤 (III) 得到的液浆和 / 或水相里，以碳水化合物总量计算，包括至少 40% 的发酵糖。

10、权利要求 1 所述的方法，其中，步骤 (IV) 的乙醇发酵是由选自啤酒糖酵母、毕赤氏酵母属、热厌氧杆菌属和发酵单胞菌属的发酵微生物来完成的。

11、权利要求 1 所述的方法，其中，所述木质纤维素生物物质材料选自花园废弃物、木屑、湿草、干草、水果荚壳以及种壳。

12、权利要求 1 所述的方法，其中所述木质纤维素生物物质材料选自燕麦秸秆、大麦秸秆、小麦秸秆、黑麦秸秆、燕麦荚壳、大麦荚壳、小麦荚壳、黑麦荚壳、稻米荚壳、小米荚壳、高粱荚壳、玉米荚壳、油菜籽荚壳、棉花籽荚壳和向日葵籽荚壳。

13、权利要求 1 所述的方法，其中，在步骤 (II) 中含水液浆经过湿法氧化处理。

14、权利要求 1 的方法，其中，在步骤 (II) 中含水液浆经过蒸气爆炸处理。

15、权利要求 1 的方法，其中，步骤 (II) 是作为批处理过程在密封可加压并留有盛装含氧气体或水蒸气以及有或无其它气体的自由体积的反应器中完成的。

16、权利要求1的方法，其中，步骤(II)是作为批处理过程在密封可加压并带有反应混合物回流的反应器中完成的。

17、权利要求1的方法，其中，步骤(II)是作为连续处理过程在大致为管状的反应器中完成的。

18、权利要求1的方法，其中，步骤(II)中所应用的反应器具具有从 0.5×10^5 帕斯卡至 35×10^5 帕斯卡的初始氧气分压。

19、权利要求1的方法，其中，步骤(II)是在100摄氏度以上的温度中进行的。

20、权利要求1的方法，其中，步骤(II)是在120--240摄氏度的温度范围中进行的。

21、权利要求20的方法，其中，步骤(II)是作为湿法氧化处理过程在低于200摄氏度的温度下进行的。

22、权利要求20的方法，其中，步骤(II)是在180--210摄氏度的温度范围中进行的。

23、权利要求1的方法，其中，步骤(II)反应过程持续1分钟到1个小时的时间。

24、权利要求1的方法，其中，步骤(I)的含水液浆中所包含的纤维素、半纤维素和木质素经过步骤(II)对含水液浆氧化后，至少60%被回收。

25、权利要求1的方法，其中，步骤(VI)的发酵废水排放液里抑制物质的水平减少了至少80%。

26、权利要求1的方法，其中，步骤(VI)中至少5%的处理后的废水排放液被引入前面从步骤(I)到步骤(V)中的任何一步。

处理木质纤维素材料的方法

技术领域

从广义上说，这是一个将木质纤维素生物物质转化成可燃燃料产品的发明。具体的说，该发明提供了一个连续的发酵转换过程，即通过这一过程把生物物质转化为乙醇，并使全部或部分乙醇发酵的工艺废水得到回用，从而在很大程度上减少了工艺水的消耗。

背景技术

全球能源需求的日益增加和人们环境意识的提高，导致了人们对化石燃料的替代能源的广泛关注。人类在生产和生活活动燃烧化石燃料的过程中，导致了大气中二氧化碳排放总量的显著增加。二氧化碳被认定是一种所谓的“温室气体”，因此它会导致全球变暖。

与燃烧化石燃料所产生的能量相比，燃烧当前的生物物质（主要以收割的植物物质形式存在）或者从这些生物物质中获得的燃料被称为“二氧化碳中和燃料”。因为燃烧一定量的生物物质所排放的二氧化碳量与这些生物在最初形成的时候从大气中所吸收的二氧化碳的量是相同的。

在所有从植物物质获得的燃料中，乙醇尤其受到人们的关注，因为它有潜力替代或补充那些从石油中炼制出来的液体碳氢产品。为了降低用生物物质生产乙醇（以下也被称为生物乙醇）的成本，就应该重点使用低成本的园艺、农业、森林、木材工业等的副产品，如稻草、玉米茎、森林废物（木屑、树皮、树干、树枝等）、锯屑和木头碎片等材料均可以用来生产生物乙醇。

然而从总的来说，生物乙醇的价格与传统化石燃料的价格相比尚不具备竞争力。因此，需要通过优化或改进生物乙醇的生产技术来尽可能的降低生物乙醇的生产成本。

影响的生物乙醇商业化规模生产的一个重要因素是工艺用水的费用。一般说来，如果回用采用传统工艺用上述生物物质生产生物乙醇的

生产废水，废水中所含有的一些物质会降低木质纤维素材料预处理的效率，抑制预处理后物质的水解以及水解之后糖类的发酵。所以，目前生物乙醇的生产情况是排掉这些生产废水，用新鲜水取而代之。

因此，工业上需要设计一套可以使全部或者部分工艺水可以得到回用的生物乙醇生产装置。

US5,221,357 描述了一个处理纤维、半纤维和木质纤维素等多糖物质的装置，它通过一个两步酸化水解过程生产单糖，通过湿法氧化木质素等固体生产有机酸等可溶产品，接下来将发酵单糖来生产乙醇。湿法氧化和发酵过程的残渣将被用来生产甲烷。然而，为了能够把剩下在液体和固体都回用到系统中去，必须在生产甲烷后再增加一个二级湿法氧化过程，这又额外提高了乙醇的生产成本。

所以，该技术并不能够回用废水并连续生产可燃产品，因此根本不是一个具有商业吸引力的工艺过程。

因此，本发明的显著意义在于它能提供一个将木质纤维素加工成有价值的燃料产品的连续生产过程。在这一过程当中，乙醇的发酵废水通过厌氧发酵过程被进一步生产出燃料，同时废水中那些潜在的抑制性物质浓度会被降低，使得厌氧发酵的排水可以全部或者部分地被回用。

因而本发明的工艺过程具有的优点是能够 1) 最大限度地把起始于木质纤维素生物物质中的碳转化为有用的产品，2) 减少生产过程中水的消耗，3) 最大限度地减少生产过程中产生的剩余废物。

因此，本发明的工艺过程不仅由于进一步提高了燃料产品的产量而提高了经济效益，而且也比传统的生产工艺更加有利于环境保护。

发明内容

本发明属于一个连续地将固体的木质纤维素生物物质转化为乙醇的工艺过程，因此它包含的步骤有：

(I) 提供一种生物物质的液浆；

(II) 在一个反应器中，通过提升该液浆的温度并且/或者加大氧气的压力，来获得至少部分纤维素、半纤维素和木质素被分离的液浆；

(III) 经过处理由步骤 II 产生的液浆或它的液相以至少使部分纤维素

和半纤维素得到水解，从而获得含有一定量的可以被微生物发酵的糖类的液浆或液体，从而使这些液浆或液体成为可用做乙醇发酵的中间介质；

(IV) 将从步骤 III 获得的液浆或液体进行最后的乙醇发酵；

(V) 将乙醇从步骤 IV 中获得的发酵介质中分离出来，同时排放出含有一定量抑制性物质的发酵废水。如果用这些废水进行步骤 II 至步骤 IV 中任何一步的生产，其中的抑制性物质都会限制或者抑制这些步骤；

(VI) 通过处理这些排放的废水来降低其中抑制物质的含量，以便使如果用这些废水进行步骤 II 至步骤 IV 中任何一个步骤的生产，其中的抑制性物质都不会限制或者抑制这些步骤；

(VII) 将部分或者全部处理后的废水用于进行步骤 I 至步骤 IV 中任何一步的生产；

(VIII) 连续重复进行步骤 I 至步骤 VII。

如此看来，该工艺包含了湿法氧化或蒸汽爆炸的高温处理、酶促水解、乙醇发酵和最后的废水处理等过程，这就使它能够提供一个完全可操作的连续转化固体木质纤维素生物物质的工艺过程。该发明的一个有趣儿的特点是，整个工艺过程不必结合任何消除中毒的步骤，因为任何步骤的产物都是下一个步骤中微生物的食物。

如上所述，木质纤维素生物物质在步骤 II 中需要经过一个湿法氧化或者蒸汽爆炸的高温预处理过程，在该步骤中使用的氧化剂的量应该有效地从根本上防止或者最大限度地减少糠醛和糠醛的衍生物等不希望产生的还原性产品的形成。氧气本身是最合适的氧化剂，本发明目前首选的工艺是在使反应器中氧气的分压等于或者高于环境中氧气的分压的情况下完成的。

经过了步骤 II 的湿法氧化或者蒸汽爆炸处理后而留下的不溶固体残渣中存在的纤维素和半纤维素，同没有经过该发明的方法处理的木质纤维素中的纤维素和半纤维素相比，更容易被化学水解和酶促水解而生成各种成份的单糖体（纤维素生成 D-葡萄糖，绝大多数半纤维最初素生成 D-木糖或者其它戊糖），因此促进了将葡萄糖或者木糖转化成乙醇的发酵过程，或者将木糖转化成木糖醇或者乳糖的过程。

与上面提到的酶促处理和发酵过程相关，使用本发明的工艺会促成去除大量的微生物和乙酸、2-糖醛，或者 5-羟基甲基-2-糖醛等酶的抑制性物质，以及香草醛、香草酸、高香草酸、乙酸丁香酮、丁香酸、丁香醛、丁香醇等酚类物质。否则，由于工艺第一步中木质素和其它物质降解的结果，这些抑制性物质会富集在工艺水中，从而抑制微生物或者抑制为了促进纤维素水解成葡萄糖或者已经溶解的半纤维素中木糖、甘露聚糖或者阿拉伯糖水解成相应的单糖所添加的酶的催化作用。

为此人们现在已经发现，为了避免因湿法氧化或者蒸汽爆炸来使木质纤维素的结构破裂，以及在乙醇发酵过程中而产生的羧基酸和其它潜在的发酶抑制剂等成分在工艺水中积累，可以通过好氧或者厌氧处理，应用一种或者多种能够单独或者共同以羧基酸或者其它发酶抑制剂为食物的微生物来使其减少，从而将其去除或者至少将其量降到抑制水平以下。

用这种方法处理乙醇发酵的出水时，可以产生甲烷或者其它可燃的生物气体和经过处理的废水。这些废水如果用于对木质纤维素生物物质的湿法氧化和蒸汽爆炸来得到至少部分生物物质的分离，或者是用于接下来的水解或者糖的发酵，其中的抑制物质会限制或者抑制这些分离、水解和发酵。因此，“抑制性物质”一词在这里指的是如羧基酸这样的抑制木质纤维素生物物质预处理或者如呋喃、苯酚和羧基酸这些抑制乙醇发酵的物质。乙醇发酵后剩余的有机物，也被称作化学需氧量（COD）可以呈现以相当高的百分比（通常约 80% 或者更高）被转化为沼气，因此，大大减少了整个过程中废物的发生量。

如前所述，本发明的工艺的步骤 II 中包含湿法氧化或者高温处理，即木质纤维素物质的蒸汽爆炸过程。这里所用“湿法氧化”或者“湿法氧化的”一词指的是发生在含水介质中，也就是在液态水或者至少含有相当一部分液态水的液态介质中，并且存在以某种方式并在某种程度上与介质中的一种或多种组分或者类别（一种固体或者几种固体，或者以溶解的形式）发生氧化反应的氧化剂。这一过程一般在高温下进行，即温度明显高于室内温度或者正常的环境温度（通常至少在 100 摄氏度），

并且在至少等于该温度下含水液态介质上面水的蒸汽分压加上其它气体，如氧气的分压。如果用空气，则主要是氧气和氮气的分压。所采用的反应条件（温度和压强）不应使含水介质沸腾。湿法氧化和下面讨论的蒸汽爆炸可以把生物物质转化成二氧化碳、水和更简单、更高氧化态的有机化合物，主要是低分子量的羧酸类有机化合物。

蒸汽爆炸（Puls, 1993）或者蒸汽法是比较为人所知的湿法氧化的替代方法，可成功用于本发明的工艺中。蒸汽爆炸或者蒸汽法均可以在170--220摄氏度的温度范围内操作，例如在180--210摄氏度范围内时，反应时间为2--20分钟，但是所用化学药剂不同，在使用弱酸或者弱碱溶液浸泡处理生物物质前所添加的水也是非强制性的。蒸汽法在饱和蒸汽中操作，事先是否添加氧气、二氧化碳、硫化氢、或者硫酸作为催化剂均可以（Saddler 等）。

如前所述，本发明的工艺过程以利用的是起源于植物的木质纤维素物质，即木质纤维素，它是植物的主要组成物质，通常主要由纤维素、半纤维素和木质素构成。

纤维素是一个由脱水 D-葡萄糖单元构成的 β -葡聚糖，它是植物细胞壁的主要的结构成分，通常约占木质纤维素物质重量的 35--60%（%W/W）。

半纤维素指的是与植物组织中纤维素相连结的非纤维多糖，通常约占木质纤维素物质的 20--35%（%W/W），绝大多数的半纤维素主要由以基于 D-木糖、D-树胶醛糖为单位的戊糖（五碳）糖聚合体组成，但通常也存在非常少量的己糖（六碳）单体，如 D-葡萄糖和 D-甘露糖。

木质素是以各种被取代的 p-为基本单位的交叉结合的复杂的聚合体，通常占木质纤维素物质重量的 10--30%（%W/W）。木质素的功能被认为是在对木质纤维素物质进行某种预处理（可能非常适合应用本发明中的湿法氧化过程）而破坏其木质纤维素结构前抵御木质纤维素物质中的纤维素和半纤维素被直接生物转化（例如被发酵细菌）的天然防碍物。

为了最大限度地降低利用生物物质生产乙醇的生产成本，应重点选用低成本的副产品，例如园艺中花园丢弃的东西和由农业、森林和木材

等工业产生的废物。因此，相关的物质包括植物的梗、茎、灌木、叶、皮、根、荚、坚果、外壳、纤维、藤、稻草、干草、草、竹子或芦苇等形式存在的木本的或非木本的植物物质。

在本发明中首选的木质纤维素物质包括木材（软木和硬木）、稻草、秸秆和所谓的荚壳。本发明所选用的木材一般指从落叶或常青的树木或者灌木中获得的中部木质（心材）、外部木质（次木质部）。从这些树木或者灌木的根部获得的木材也是有价值的。

重要的木材来源包括品种众多的各类针叶和阔叶的乔木和灌木。针叶类可提及下面各类：包括松树的柏类、银冷杉类、云杉类、落叶松类、道格拉斯冷杉类。阔叶类可提及下面各类：桦树类、榉类和橡树类。

重要的秸秆来源特别包括壳类植物（壳类禾本植物），即产出可食的谷物或种子的禾科植物。例如，从燕麦、大麦、小麦、黑麦、稻、小米、高粱、荞麦和玉米的秸秆都适合本发明的处理工艺。

这里所说的“荚壳”一词通常指所有果实或者种子的外皮、外壳、荚和果托，但此词在此也包括例如玉米穗的外皮。有关的荚壳包括下列荚壳：

燕麦、大麦、小麦、黑麦、稻、小米、高粱、荞麦、玉米及玉米穗、油菜籽、棉花籽、杏仁和向日葵籽的荚壳。

上面这些壳类植物的荚壳中，从总体上说本发明更为注重的是这类植物中燕麦和大麦的壳。与此相关的例子是生产加工燕麦片、燕麦粥和燕麦卷等的过程中而产生的大量的廉价副产品。在丹麦、挪威、瑞典和北部德国，每年因加工燕麦而产生的副产品—燕麦壳大约 75,000 吨。

与本发明相关的其他荚壳还包括椰子的外壳、花生壳、可可的壳及皮、坚果壳等。应当注意到，木材、秸秆和干草等木质纤维素物质的自身形状、体积或尺寸必须适中，或者至少能够（例如，通过碾磨、研磨、捣磨、挤压、劈砍或者切削等等）将这些物质破碎，在某种程度上获得这些物质的尺寸足够小或者比表面积足够大的颗粒、碎片、纤维、细条、薄片和碎屑等，以便使这些物质的降解能够顺利而有效地进行。对于锯木厂、林业和其它大规模木材产业产生的锯末、木屑、刨花、树

枝等木材的废物来说，其合适的尺寸往往很容易就可以得到。

相反，例如壳类谷物或者种子荚壳的多种荚壳，包括该发明的生产范例所采用的燕麦壳，其自身的尺寸足够小并且比表面积足够大，一般不必对其进行破碎就可以作为木质纤维素物质加以应用。

在湿法氧化反应器中，木质纤维素物质的与液态含水介质的最初比例一般为 0.02--1 千克/升，通常为 0.05--0.35 千克/升，例如可以为 0.05--0.2 千克/升。这要根据被处理的木质纤维素物质的形状、体积和尺寸而定。在工业化规模的生产中，在以可行范围内的最高的木质纤维素物质与液态含水介质比率运行本发明的工艺装置时，其经济效益最高。因为高比率时，可以使木质纤维素物质与含有氧化剂的液态含水介质得以充分混合，从而得到木质纤维素物质的令人满意的高降解率。

通过采用本发明所推荐的材料和提出的方法，在工业化规模的生产上就可以省去耗时、耗能因而昂贵的破碎工序。破碎工序既需要对破碎机器极其附属设施投资，又需要对这些破碎机器极其附属设施进行维护。

尽管如此，在处理前某些木质纤维素物质（例如某些坚果的壳），最好还是使其经过一道破碎处理的工序（例如通过碾磨、研磨、捣磨、挤压、劈砍或者切削等等），通过提高这些物质的流动性、可混合性、比表面积等来强化其全部反应性能。

木质纤维素物质的预处理（本发明工艺的步骤 I 和步骤 II）

如前所述，将固体木质纤维素物质连续地转化为乙醇的工艺的第一个步骤是产生木质纤维素生物物质的含水液浆。由此得到的液浆在工艺的第二个步骤将被加压或者加氧，使这些生物物质中至少部分的纤维素、半纤维素和木质素被分离出来。

具体方法之一是将步骤 II 中的含水液浆经过前面介绍过的湿法氧化处理。具体方法之二的是将步骤 II 中的含水液浆经过前面也介绍过的蒸汽爆炸处理。湿法氧化处理和蒸汽爆炸处理在此被称为预处理。不难理解，蒸汽爆炸处理也可以在木质纤维素生物物质不以含水液浆的形态存在时进行。

氧化剂

前文已经提到过，如果在预处理过程中使用氧化剂，本发明工艺的首选的氧化剂是氧气本身。关于其它氧化剂，在适当的浓度、温度和停留时间等条件下，尤其适合本发明湿法氧化处理工艺的是过氧化氢。过氧化氢很容易溶于水，它的商品化的水溶液，无论是稀释的（过氧化氢浓度约 3%W/W）还是浓稠的（过氧化氢浓度约 30--35% W/W），均可以购买得到。和氢气一样，从环保的角度来讲，它也是一种非常可以接受的氧化剂。

因此，从总体上说，过氧化氢是一种非常适合在上述液态含水介质中选用的氧化剂，既可以单独使用，又可以与氧气等其它一种或者多种氧化剂联合使用。在这些情况下，过氧化氢在液态含水介质中的适宜起始浓度范围一般为 0.5--10%W/W。

本发明工艺不宜选用作为氧化剂的氧化性物质包括具有氧化性的酸，例如浓稠或者稀释的硝酸。

如前所述，当选用氧气作为氧化剂时，工艺过程最好在所加入的氧气的起始浓度等于或者高于外界环境中氧气的分压（即在周围空气中氧气的分压，它在海平面时一般为 0.2×10^5 帕斯卡，典型值约 0.21×10^5 帕斯卡）的情况下进行。氧气的起始分压在 $0.2--35 \times 10^5$ 帕斯卡时，一般较为适宜。然而通常采用的氧气的分压应至少为 0.5×10^5 帕斯卡，通常在 $0.5--35 \times 10^5$ 帕斯卡范围内。氧气的起始分压的典型值在 $1--15 \times 10^5$ 帕斯卡的范围内，例如 $3--12 \times 10^5$ 帕斯卡范围内的 $5--12 \times 10^5$ 帕斯卡。在本发明的工艺中，氧气在水中在相关温度下的溶解度随着氧气的分压而升高，因此提升氧气的分压有利于获得足够的溶解氧。

所加氧气既可以是基本纯净的氧气，也可以是含有氧气的混合气体（例如空气），其中除了含有氧气以外，还含有一种或者多种其它不危害本发明工艺操作的气体（例如氮气或氩气等某种惰性气体）。然而，通常选用接近纯净的氧气（例如纯度大于或者等于 99% 的氧气，已经是可以买到的装在常规加压气瓶中的商品了）更为有利。

当选用氧气作为氧化剂时，尤其在批式操作过程中，氧气（或者是含有氧气的混合气体）将以一定适当的起始压强，作为唯一的添加物质

被加入密封的、有时还可能是加压的并装有选好的适量的木质纤维素物质的反应器中。

用于本发明湿法氧化处理的批式操作反应器，除了装有一定体积含有待处理木质纤维素物质固体的含水液体外，通常在液相的上面还留有一定体积的自由空间。很明显，如果不考虑其它因素，自由空间体积与液相体积的比率越高，为了确保反应器中有足量的氧气所需要的氧气的起始压强（分压）就越低。在反应器或者反应装置内起始温度下测得氧气在反应器内部的分压，在工艺操作进行的过程中会由于内部发生的氧化反应对氧气的消耗而降低。

这里只用一个批式可密封和加压的反应器（此处以一个闭路的反应器为例）作为例子。如果在运行时它每升的液相中含有 60 克的木质纤维素物质，自由空间的体积与液相体积的比率为 1: 1，那么当氧气的起始压力范围为 $0.2-12 \times 10^5$ 帕斯卡时，就可以保证其最典型的氧气量。此外，因为在适用范围内的某一分压值，氧气在水中的溶解度（和其它一些气体，包括氮气）在 100 摄氏度以上时会随着温度而增加，在 140 摄氏度以上时会随温度增加得更快。为了液相中溶解氧的浓度足够高选用高于后者的温度，不仅对于这里所举的批式密封反应器有利，对于其它形式的反应器也是有利的。同样道理，为了能够使用分压相对较低的氧气，可以进一步升高温度来确保含水液态介质中溶解氧的浓度仍然满足需要。

在另一种情况下（即最常用的连续或近似连续的反应装置，木质纤维素物质基本上是连续进入湿法氧化反应器的，而工艺的产物也是基本连续排除或者被排除的），氧气或者含有氧气的混合气体是在某一合适压力下基本连续地（或至少以某一适当频率的间隔）被加入反应器的，这样就保证了足够的氧化剂得到不断的供给。

反应器皿

用于进行本发明步骤 II 中湿法氧化处理或者蒸汽爆炸的反应容器通常为罐或者类似罐的容器，一般是密封（不与周围空气相连通）的，也可以是可加压的反应器皿。前面已经提到过一些尤其适合本发明批式湿

法氧化处理的密封可加压反应器皿。本发明的一个具体情形是步骤 II 以批式反应在一个密封可加压的并留有可容纳含氧气体或者水蒸汽的自由体积反应器中进行。

适合进行批式或者连续式湿法氧化或者蒸汽爆炸的反应器皿包括基本竖直放置的反应器。使用这样的反应器时，液态含水介质和木质纤维素物质被放入其中后，氧气或者含有氧气的混合气体（适合用空气）可以通过一个或者多个位于反应器底部或者位于反应器装有木质纤维素物质的含水液浆部分的长方向的入口、孔口或者阀门等，连续地或者间隔地被加入反应器。这类反应器可以是圆柱状、管状或者其它合适的形状。本发明适合采用的立塔式反应器在 GB706, 686 和 GB812, 832 中有描述。

适合进行本发明的连续式或者基本连续式湿法氧化或者蒸汽爆炸的反应器，也可以是管状或者接近管状的反应器。这种反应器非常适合水平放置，液相物质是通过泵吸入或者打压进去的。原则上，它的上部是没有或者仅有一点自由空间可以容纳气态的氧气。这类反应器通常安装有一个或多个定位合适的注射孔、注射口或者注射阀门等将氧气（注入含有氧气的混合气体是次选的）或者蒸汽直接注入液相。例如这些将这些注射孔、注射口或者注射阀门等安装在接近反应器开始一端，或者沿反应器的长方向安装一个或者多个，使注入的氧气或者水蒸汽至少大致均匀地溶解在液态介质中，使其充分与要处理的木质纤维素物质接触，以使注入的氧气的氧化效率最高，使高温蒸气对降解的影响作用最大。

对本发明的连续湿法氧化和高温处理工艺来说，在可能的情况下应尽量使液浆与反应器中的气相自身相混合。这虽然可以通过转动整个反应器或者其它可行的方法来达到，但是最好还是通过机械搅拌液浆来达到。当选用下文描述的普通型再循环反应器（“环路反应器”中液相在反应器的管状截面内被泵、叶轮等循环）进行批式处理时，通过以适当的流量回流液相（含有木质纤维素物质），通常可以确保混合充分。因此，本发明的一个手选的具体方法是，步骤 II 在一个密闭可加压反应器中进行批式反应时，回流反应的混合物。同样地，当在一个大致管状、圆柱

状或者类似形状的反应器中进行基本连续式的反应时,通过提高液相(含有木质纤维素物质)在管状、圆柱状或者类似形状的反应器中的流速,可以达到充分混合的目的。

温度

如上所述,本发明步骤 II 的最佳温度条件是在接近或者超过 100 摄氏度。一般来说,在 120--240 摄氏度的温度范围内,例如 180--220 摄氏度的温度范围内,更具体地说,在 180--210 摄氏度的温度范围内时,均适合本发明在大多数情况下的生产工艺。如果所选用的木质纤维素物质非常合适,所设定的温度可以在 160--210 摄氏度的温度范围内,例如可以选用 180--210 摄氏度的温度范围。在 185--195 摄氏度的温度范围内或者在 170--190 摄氏度的温度范围内时,可以得到很好的效果。前面已经提到,这里所选用的温度应当是在给定的压力条件下含水液态介质不至沸腾的温度。然而,步骤 II 的更为适合的具体操作温度是低于 220 摄氏度,包括低于 200 摄氏度,低于 195 摄氏度,包括低于 190 摄氏度,低于 185 摄氏度,包括低于 180 摄氏度和 175 摄氏度。

然而,所设定的温度应适宜木质纤维素物质同产生的纤维素、半纤维素和木质素的有效分离,同时不至破坏太多的多糖分子,因为这些多糖分子是下一道工序中生产乙醇的微生物直接的营养物质。如下面表 2.2 中的例子所示,停留时间与反应器中的温度存在着一个相关关系。从总体上说,为了达到木质纤维素物质在某种程度上的分离,反应时间越段,所需温度就越高。

可以采用任何合适的方法向反应混合物(明显是液相和木质纤维素物质)供热。例如,把反应器浸没在适当的(装有油、熔化盐或者熔化的金属)热浴箱中,或者通过将导热管(通常为金属的)缠绕在反应器的外面或者浸没在反应器内部,使适当热的油或者过热水蒸汽等在其中通过。同样,也可以将一种或者多种阻电加热元素缠绕或者缠绕在反应介质中。其它可用于加热的方法包括电磁感应加热(当反应器是金属的时候)和微波加热。

应当注意到,本发明工艺的可取特点在湿法氧化处理或者蒸汽爆炸

处理时会发生降解反应，这通常会导致一定比例的木质纤维素物质的氧化降解或者热降解，特别是木质素和一些半纤维素的降解，但也有果胶（通常在某中程度是以在木质纤维素物质的形式存在）。从总体上说，这些由氧化或者由加热引起的反应都是放热的，产生的热量可以用于减少向反应器中反应混合物加热所需的热能，因此有利于保持反应所需要的理想温度。

停留时间

在对本发明所采用的湿法氧化或者蒸汽爆炸过程的含水液态介质中的木质纤维素物质加热时，加热时间一般为大约1分钟至大约1小时（即1--60分钟），这不仅依赖于其它反应条件（例如反应温度、氧化剂的种类和浓度），而且依赖于木质纤维素物质的反应性能（反应率）。本发明的具体经验是，步骤II的反应时间范围是5--30分钟，通常是5--15分钟。当其它反应条件都在适宜的范围内时，例如氧气的（分）压力在 $3--12 \times 10^5$ 帕斯卡范围内，例如 $3--10 \times 10^5$ 帕斯卡，温度大约在160--210摄氏度范围内时，适宜的反应时间通常大约在大约10分钟至大约15分钟范围内。

反应物中 pH 值的调节

在很多情况下，因为液浆在反应前和反应进行过程中是中性的，所以在步骤II不必对其PH值进行调整就可以得到令人满意的反应效果。然而，对本发明相关的一些种类的木质纤维素物质来说，在反应前或者反应进行过程中调整反应物的pH值是有必要的。pH值会降低，即呈酸性，但是通过加入适量的碱或者碱类化合物（例如，氢氧化钠、氢氧化钾等碱金属的氢氧化物，氢氧化钙等碱土金属的氢氧化物，碳酸钠、碳酸钾等碱金属的碳酸盐，氨等其它碱性化合物）或者缓冲系统，可以提高反应物的pH值。因此，本发明的具体操作是使步骤II的中的液浆处于碱性条件中。

如上所述，步骤II的主要目的就是使木质纤维素物质的结构破裂而得到半纤维素和纤维素。因为溶解的多聚糖，即纤维素和半纤维素和预处理过程中产生的糖类与羧基酸分别是接下来用于乙醇发酵和甲烷发酵两类微生物各自的营养来源，所以破裂过程应尽量柔和，以免多聚糖被

破坏。因此，本工艺的一个很重要的具体做法是，当液浆被送到步骤 II 中进行预处理后，至少使液浆内木质纤维素物质中 60%、70%、80% 或者 90% 的多聚糖得以保留。

已经表明，本发明步骤 II 剩下的不溶固体残渣非常适合用作动物食料，或者动物食料的补充物，尤其适合牛、绵羊、山羊和鹿等对农牧业非常重要的瘤胃动物。该步骤剩下的固体残渣一般富含纤维素纤维，可应用于植物生长介质领域（例如在栽培土或堆肥领域，在泥炭沼泽类有机介质等）、土壤改良剂（加入后可以改善土壤的蓄水性、土壤的通风性和适于根的穿透性等）和复合材料（将该固体残渣以适当的比率与一种或者多种其它材料（例如聚乙烯和聚丙烯塑料等）结合而生产的建筑材料，它改变了某些与后者有关的性能）。

浆液（抑或含水相）的水解（本发明工艺的步骤 III）

经过步骤 II 的处理后，液浆将经过下一步处理。在这里，至少部分的纤维素和半纤维素被水解，从而得到含有一定量可以被微生物发酵的糖类，因此，这些液浆可以被用作酒精发酵介质。

水解处理的目的是水解步骤 II 中由纤维素抑或半纤维素通过湿发氧化或者蒸气爆炸所得到的寡聚糖和多聚糖，来形成发酵糖（例如葡萄糖、木糖或者其它可能的单糖）。这些处理既可以是化学反应，也可以是酶促反应。然而，根据此发明所得到的纤维素，如果不用来将其转化为葡萄糖，也可以用作造纸工业的纤维。

化学水解通常可以通过众所周知的方法，即用酸处理，可以非常容易地达到。例如，用稀释的硫酸水溶液（例如 2--10%WW，通常 4--7%WW）在 100--150 摄氏度的温度范围内，例如在大约 120 摄氏度，处理 5--15 分钟，例如大约 5--10 分钟。用大约 4%WW 的硫酸处理，通常在 120 摄氏度经过 5--10 分钟较为适宜。

酶促水解同样地也可以用一个众所周知方法，即用一种或多种适宜的糖酶（糖元酶，EC3.2）处理，就可以达到。适宜的水具体做法是，在解纤维素或者纤维素片段时，糖酶从由纤维素水解酶（EC3.2.1.4）组成的组中选取。在水解木聚糖时，选用一种木聚糖水解酶（例如内-1,4- β -

木聚糖水解酶, EC 3.2.1.8)。在水解可溶的纤维素片段转化为葡萄糖时, 选择包括葡聚糖-1,3- β -糖元水解酶(外-1,3- β -葡聚糖水解酶, EC3.2.1.58) 或者内-1,3(4)- β -葡聚糖酶 EC3.2.1.6 在内的 β -葡萄糖水解酶。在水解果胶或者其它乳胶时, 选用果胶酶(聚乳胶酶, EC3.2.1.15) 与此相关的酶的商业化产品, 包括 Celluclast™, 均可以从地处丹麦的巴格斯瓦市的 (Bagsvaerd) 的诺和诺德公司 (Nordisk A/S) 购买得到, 例如 Celluclast™ 1.5L (液体准备)。Celluclast 既能水解纤维素 (将纤维素降解为葡萄糖, 纤维胶和更高的葡萄糖聚合物), 在一定程度上又能水解木糖。

由水解得到的发酵糖, 尤其是寡聚糖等产品, 对进一步转化很有用, 因为它们能够生成有用的产品 (例如乙醇或木糖醇)。因而, 通过应用这里描述的微生物, 可以将葡萄糖 (由纤维素得来) 和木糖 (由半纤维素中的木聚糖得来) 转化成乙醇。通过设定的方法 (例如通过催化加氢或者通过发酵), 木糖还可以转化为木糖醇。

比较好的情形是, 如果按总碳氢含量计算, 从步骤 III 获得的液浆或含水相至少包含 40% 可以被微生物发酵的糖, 例如至少含有 50%、60%、70% 微生物发酵的糖。

乙醇发酵 (本发明的工艺的步骤 IV)

本发明工艺的下一个工艺步骤是采用一种或者多种能够将步骤 III 产生的液浆 (或含水相) 中的寡聚糖抑或单糖降解为乙醇的发酵微生物, 对该液浆 (或含水相) 至少进行一次发酵。

可以看出, 如果希望将步骤 III 和步骤 IV 和在一起在同一个反应器中进行, 也是可以的。这样, 在对可被微生物发酵的糖类进行水解的同时, 应用一种或者多种微生物将其发酵成乙醇。

关于用葡萄糖来产生乙醇的发酵, 在本发明的工艺中可以使用任何可将葡萄糖转化为乙醇的微生物。例如, 合适的微生物包括嗜温微生物 (即最适合生长的温度范围是 20--40 摄氏度的微生物) 和酵母。酵母也称被为“面包酵母”, 即啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 。

关于用木糖来生产乙醇的发酵, 在本发明的工艺中可以使用任何可将木糖转化为乙醇的微生物。有用的微生物包括某些嗜热微生物 (即

最适合在高温时生长的微生物，温度一般高于 50 摄氏度)和通过基因工程从那里得到的微生物。

更为适宜的情形是，从由包括迈氏热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter mathranii*) 在内的热厌氧杆菌属和由包括运动发酵单胞菌在内的发酵单胞菌属 属组成的类中，或者从毕赤氏酵母属等酵母中，选取合适的微生物用于乙醇发酵。例如，Sonne-Hansen 等 或者 1993Ahring 等 1996 中所描述的迈氏热厌氧杆菌中有一个用并被命名为 A3M4 的族。

通常所希望的是，从上述有用微生物中与其相关的某一微生物通过基因修饰而得到的某一有用的乙醇发酵微生物，能够具有提高或者增强了的乙醇发酵活性。这里所用的是“基因修饰的细菌”一词的传统意义，即通过使某一有机体通过传统意义上的基因突变处理而得到的菌株。这些基因突变处理包括使用 EMS (黄酸化乙烷甲烷) 或者 NTG (N-乙基 I-N¹-硝基-N-硝胍) 的化学突变剂、紫外线、包括经典突变在内的自然突变而进行的处理。而且，由于基因修饰细菌可以通过自由突变或者选择性自然突变即不需要重组 DNA 技术来获得。所以可以拟想，上述有机体的基因突变可以通过现场直接突变技术、聚合酶链式反应 (PCR) 技术获得，或者一旦某些特殊 DNA 排序已经被确认和分离，再应用其它内外技术来获得。

在应用对最佳生长温度要求不同的微生物分别将葡萄糖和木糖发酵而产生乙醇时，将该发酵过程分两步进行效果会更好。这时，经过步骤 III 后获得的液浆 (或含水液相) 首先在适宜的条件下与某一微生物接触 (例如，在大约 30 摄氏度时与啤酒糖酵母接触)，接下来再在另一适宜条件下与另一微生物接触 (例如，在大约 70 摄氏度时与迈氏热厌氧杆菌接触)。这两步适宜在独立的反应器中进行，也可以在同一个反应器中以连续的方式进行。

已知适用的各种发酵反应器 (发酵罐) 均可以用来进行这样的一步或者多步发酵。如果想进一步详细了解如何选用合适的反应器，可参阅 J.E.Bailey and D.F.Ollis, 1986 等文献或手册。不论是用于批式发酵还是用于连续发酵的，在这里均可以查到合适的。

乙醇发酵的下一步，是将乙醇从步骤 IV 中获得的发酵介质中分离出来，同时产生含有一定含量抑制性物质的发酵废水。如果将这些发酵废水用于步骤 II 至步骤 IV，其中抑制性物质会限制生物物质的部分分离、糖类的游离和乙醇的发酵的进行。这里所说的“会限制生物物质的部分分离、糖类的游离和乙醇的发酵的进行”的抑制性物质，是指在步骤 II 的湿法氧化和蒸汽爆炸过程中，或者在步骤 IV 中由乙醇发酵细菌产生的物质。这些物质有包括醋酸和乳酸在内的羧酸类，包括 5-羧基糖醛、2-糖酸和 2-呋喃甲酸在内的呋喃类，包括愈创木酸、丁香醇、4-羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛、3,4,5-三甲氧基苯甲醛、4-羟基苯乙酮、香兰醛甲基酮、乙酰丁香酮、3,4,5-三甲氧基苯乙酮、4-羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、P-香豆酸和阿魏酸在内的苯酚类。

另外，这里所说的“一定含量”是指上述抑制性物质的在能够抑制或者降低预处理、水解和乙醇发酵时的浓度。如果湿法氧化和蒸汽爆炸在羧酸等有机酸浓度不断升高，即所使用的是有机酸含量很高的工艺回流水时，纤维素和半纤维素的蒸馏就会受到影响。而且，预处理会产生更多的有机酸和呋喃，达到一定浓度时就会抑制微生物的生长。

废水处理（本发明步骤 VI 的工艺）

前面已经指出，本发明工艺最后是将步骤 V 和步骤 VI 产生的废水进行处理，例如进行生物处理，由此在一定程度上减少了所产生抑制性物质的量，如果将废水引入前面从步骤（II）到步骤（IV），既不会限制预处理反应速率，也不会抑制水解和乙醇的发酵过程。

这种处理的首选方案是选用一种或多种能够降解或转化存在于上述废水中的抑制性物质的厌氧发酵微生物，对其进行厌氧发酵，同时产生甲烷等可燃燃料。

微生物

本发明的一个很有用的方案即步骤（VI）的处理是由甲烷微生物（也叫做产甲烷菌）来完成的，这种甲烷微生物是原核生物中的一个独特种群，它能够在厌氧条件下从某一有机质、含甲基物质（甲醇、甲胺、二甲胺、三甲胺、甲硫醇及二甲基硫）或乙酸（有时被称做乙酸分裂性物

质)中获得甲烷。

甲烷微生物存在于不同的菌属中,此发明在本文中提到的相关产甲烷细菌包括甲烷杆菌属、甲烷短杆菌属、甲烷嗜热菌属、甲烷球菌属、甲烷微菌属、产甲烷菌属、甲烷螺菌属、甲烷盘菌属、甲烷球形菌属、甲烷八叠球菌属、甲烷叶菌属、甲烷袋状菌属、甲烷丝菌属、鬃毛甲烷菌属、甲烷嗜高热菌属或甲烷粒菌属等菌属。其中值得一提的是菌属甲烷嗜高热菌属,它为高度嗜热菌属,能够在超过100摄氏度的温度下生存。只有三种产甲烷菌属即甲烷八叠球菌属、鬃毛甲烷菌属和甲烷丝菌属及能够进行乙酸分解反应,即将乙酸转化为甲烷(和二氧化碳)。如果可利用的产甲烷细菌可以从以上这些可利用的微生物或从这些微生物中获得的相关衍生物中的某种细菌经基因修饰后筛选出来,微生物的产甲烷活性就会增加或被改善。这种基因修饰微生物可以通过以上讨论的方法获得。

此发明除了对一种或几种甲烷微生物非常有效以外,普遍适用于大部分其它种类的一种微生物或几种微生物的合体,这些微生物能够降解在本发明工艺中厌氧发酵步骤所处理材料当中的有机物质,但是它们在厌氧发酵步骤中并不能直接用来作为生产甲烷的物质。这些其它种类的微生物包括具有转化能力的特定发酵厌氧菌,例如将葡萄糖转化为像乙酸、丙酸、丁酸、氢气和二氧化碳的发酵厌氧菌和所谓的能够把丙酸、丁酸和乙醇转化为乙酸、甲酸、氢气和二氧化碳的产乙酸菌。

但是,废液的处理也可以用好氧菌处理来完成,所利用的好氧微生物能够利用上面提到的抑制性物质而把这些物质的量减少到一定程度,如果将废水引入前面从步骤(II)到步骤(IV)既不会限制反应速率。

反应器类型

本发明工艺中步骤(VI)的处理工艺可以用一种叫做“上流式厌氧污泥床”(UASB反应器)的反应器来完成,如在Schmidt and Ahring(1996)当中描述的那样。这种类型反应器通常的形状为直立圆桶,如图1所示。

处理废液的回用(本发明步骤VII和步骤VIII的工艺)

如前所述,此发明的一个非常重要的特点是能够全部或部分处理过

的发酵废水在经过步骤(VI)处理以后被回用作为此发明工艺中的含水液相,因此,减少了水的浪费并把处理过程中出现的废物量降到最低限度。在此发明工艺的任何一个步骤中,都有可能利用处理过的废水连续重复从步骤(I)到步骤(VII),因此能够连续把固体木质纤维素材料转化为乙醇和甲烷。例如,通过把处理过的废液引入步骤(II)或步骤(III)到(IV)中而在这些步骤中获得含水液浆。

因此,首选方案即从步骤(V)当中所产生废水里至少5%被引入此发明工艺当中的任何一个步骤中,引入的废液量可以是10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%甚至可以是100%。处理过的废水被大量的引入前面的工艺步骤当中而不会降低前面步骤当中乙醇或甲烷的产量。

因此,本发明步骤(VI)中废水处理的目的是减少存在于废水当中的有机物质(COD)如羧酸、呋喃和酚类化合物等抑制性物质,这样,当处理过的废液被重新引入到工艺流程当中后就会保证抑制性物质不会限制或制约生物物质的部分分解、水解和乙醇发酵。相应地,很大一部分剩余有机物(COD)在经过乙醇发酵后可以被转化为生物沼气。因此,首先方案即为至少50%的COD剩余物在经过乙醇发酵后被转化为生物沼气,其中包括60%、70%、80%甚至85%的COD。以下所举的例子就会说明步骤(VI)的完成会减少存在于该步骤发酵废液里至少80%的抑制性物质,其中包括85%、90%、95%甚至达到100%。

本发明将在以下非限制性的例子当中作进一步的阐述,这些例子都是在实验室中试规模下进行的,并阐述了本发明工艺的具体方案,如图所示。

附图说明

图1展示了“上流式厌氧污泥床”反应器(UASB反应器)的简图,这种反应器对于发明工艺中步骤(VI)的厌氧发酵处理很有效。UASB反应器利用了反应底部固定的呈层状的污泥颗粒1中的生物物质。待处理的液相经过反应器底部一个或者更多的孔口A进入并经过这个污泥生物物质颗粒层。在反应器的顶部是一个处理后的上流液相和厌氧发酵过

程中产生的气体可以通过，但是菌胶团不可以通过的筛子。厌氧发酵过程中产生的一些气体（例如甲烷和本发明中有可能产生的二氧化碳）会暂时吸附在微生物污泥的颗粒上，使 2 中颗粒的浮力增加而上浮穿过液相。当这些颗粒碰到了筛子 3，其中使其上浮的气体被碰掉后，这些颗粒就会重新沉淀回到反应器底部。经过处理并通过筛子的液相在一个或者多个液相出口 L 被抽出，气相在一个或者多个气相出口 G 被抽出。在有含甲烷气体（本发明工艺就是这样）产生时，这些气体可以贮存在贮气柜里，或被大致连续地抽出来用于生产热电。

图 2 展示了本发明用于对木质纤维素物质进行有效预处理的湿法氧化反应器（“闭路反应器”）的简图。该闭路反应器的详细描述可以参见 Bjerre 等 (1996)。该反应器包括一个内直径为 11 厘米、高 18 厘米的桶状钢制容器和一个长 160 厘米、内直径 22 毫米的外挂钢管。钢管的一端绕在容器底的外部，另一端绕在容器下部的外面。在容器底部，连接管的上部是一个可以提供待处理悬浮物或溶液回流的离心力推动轮，此推动轮由外在容器上磁偶电马达驱动。容器顶部装有钢制的盖子，它可以被凸缘装置紧紧锁住。这盖子装有可以引入空气、氧气或者其它适当的含氧气体（通常来自高压气瓶）或者其它到达闭路反应器液相上部气室（自由体积）气体或者水蒸气的入口阀门。闭路反应器有 1 升液体悬浮物的空间，并且气室（自由体积）的体积为 1 升。

图 3 展示了实施例 1 当中使用的实验室规模玻璃反应器的简图。该反应器有 200 毫升的空间，并被热罩 1 所包裹，恒温水浴中的水通过它可以被环流。一个通入反应器并穿过热罩下部的入流管，包括一个螺旋部分 2。该螺旋部分可以避免固体生物物质由于待处理来料迅速被暴露在的达到热罩中介质的实际温度而造成的温度休克。位于反应器底部入口处的密封球 3 的作用相当于一个不可转动阀门，阻挡反应器内部物质通过入口管而泄漏出来。反应器系统作为一个整体与 12 毫米氯丁二烯橡胶相隔离。反应器顶部装有可以直接从反应器出口处抽取气体或液体样本的管子 4。位于反应器上部的一个孔口为 1 毫米的网筛 5 可以阻止悬浮的固定的生物物质从反应器中被冲洗出来。

图 4 为甲烷的生产。乙酸、潜在的发酵抑制性物质和未发酵的碳水化合物在 55 摄氏度时，通过嗜热厌氧废水处理过程，被一族产甲烷古细菌转化为甲烷。

具体实施方式

实施例 1

处理木质纤维素物质单步结果评价

1.1 材料与amp;方法

1.1.1 试剂

除非特殊注明，下面所使用的试剂均可以从实验室试剂供应商那里得到。

1.1.2 木质纤维素物质的来源

下面实验所采用的木质纤维素物质均来自于 1997 年在 Forskningscenter RisØ (瑞索国家实验室) 收获的麦草。

1.1.3 木质纤维素物质湿法氧化预处理反应器

湿法氧化反应器是一个循环的实验室规模的反应器 (以下称为“闭路反应器”)，它可以承受气体压力 (图 2)。该闭路反应器已在 Bjerre 等 (1996) 中描述过。

该闭路反应器是通过被沉浸在一个溶解盐的恒温浴中被加热的，这些溶解盐可以是 1:1 (W/W) 无水硝酸钠和无水亚硝酸钠的混合物，接下来再通过浸没在冷水中被冷却。在加热时，一般在 3 分钟以内达到理想温度，在冷却时，大约需要 1 分钟达到气力平衡。

在盖子阀门关掉的时候，这个闭路反应器就成了一个封闭的系统。在这里，反应混合物以悬浮的木质生物物质的形态存在于有氧的含水介质中，被注入容器后再在选定的时间内和选定的压力下被回流。

1.1.4 麦草湿法氧化的预处理

在进行湿法氧化之前，干草被碾成最大长度为 5 毫米的碎末，与去离子水 (每 60 克草 1 升水) 混合，并加入碳酸钠。一升的混合物被传到闭路反应器后，将闭路反应器用氧气瓶中的氧加压使压力达到 12×10^5 帕斯卡 (起始压力)。然后，反应物在 195 摄氏度时被湿法氧化 10 分钟，

冷却后，反应器中的物质被注进一个 5 升的塑料容器中并被储藏在零下 20 摄氏度。

1.1.5 生长介质

1) BA 介质 (合成介质): BA 介质准备了 1 升, 下列成分被混合在一个锥形烧瓶里:

无离子水 (Milli-Q™) 916 毫升

溶液 A 10 毫升

溶液 B 2 毫升

溶液 C 1 毫升

溶液 D 1 毫升

碳酸氢钠溶液 50 毫升

酵母提取液 1 克

用 80% 体积氮气和 20% 体积的混合气体对该混合物吹脱 10 分钟使其厌氧。测得的 pH 值为 6.9 到 7.0。该混合物在 140 摄氏度时被高温消毒 20 分钟, 然后在厌氧条件下加入下列物质:

维生素溶液 (0.1 毫升溶液每 10 毫升介质)

硫酸钠溶液 (0.1 毫升溶液每 10 毫升介质)

所使用的各种溶液的组成分别为:

溶液 A (克每升去离子水溶液): 氯化铵 (100 克/升)、氯化钠 (10 克/升)、六水氯化镁 (10 克/升)、二水氯化钙 (5 克/升)。

溶液 B (在去离子水中): 三水磷酸氢二钾 (200 克/升)。

溶液 C (在去离子水中): 刃天青钠盐 (0.5 克/升)。

溶液 D: 按照给定的顺序和给定的量, 将下列组分填加到一个 1000 毫升的容量烧瓶中:

去离子水 (500 毫升)、硼酸 (50 毫克)、氯化锌 (50 毫克)、脱水氯化铜 II (38 毫克)、脱水氯化锰 II (41 毫克)、四水钼铵 (50 毫克)、六水氯化铝 (90 毫克)、六水氯化钴 II (50 毫克)、六水氯化镍 II (92 毫克)、乙二胺四乙酸钠盐 (EDTA 钠, 500 毫克)、五水亚硒酸盐 (100 毫克)。

然后，把事先准备好的溶液加入容量瓶当中，该溶液是把二次蒸馏水（1毫升）、盐酸（1毫升）以及四水氯化铁（2000毫克）混合在一起直到该混合物中的氯化铁溶解为止，再把去离子水添入容量瓶中的画记号处。

碳酸氢钠溶液（在去离子水中）：无水碳酸氢钠（52克/升）

维生素溶液（在去离子水当中，溶液以毫克/升计算）（从Sigma购买的材料）：生物锡（维生素H，2毫克/升）、叶酸（2毫克/升）、吡哆醇（维生素B₆，10毫克/升）、核黄素（维生素B₂，5毫克/升）、盐酸硫胺素（维生素B₁，5毫克/升）、氰钴胺素（维生素B₁₂，0.1毫克/升）、烟酸（5毫克/升）、对氨基苯甲酸（5毫克/升）、硫锌酸（5毫克/升）、DL-泛酸（5毫克/升）。由于这种溶液在140摄氏度下进行高温消毒的时候不稳定，所以先要用氢气吹脱使其脱氧后再过滤到厌氧条件下经过高温消毒的药水瓶中贮存以备用。

硫化钠：一个Erlenmeyer烧瓶中的一升去离子水用氢气吹脱后使其脱去氧。一部分25克的硫化钠（NaS·7-9H₂O）被称出来后加入到烧瓶（顶盖部）中继续用氢气吹脱。然后，溶液中20毫升的等分试样在厌氧条件下被转移到100毫升的药水瓶中并使药水瓶在140摄氏度下进行高温消毒。

2) 酵母生长介质（YM）：这种介质包括被添加其它维生素、痕量金属、酵母提取物以及吐温™80/麦角固醇溶液的BA介质。以下为准备好的包含有维生素、痕量元素以及麦角固醇/吐温™80的储存溶液：

维生素溶液（100毫升）：

(i) 在1毫升0.1M的氢氧化钠克生物锡；

(ii) 在溶液(i)添加约80毫升的水；

(iii) 通过再加入1M盐酸/1M氢氧化钠把溶液(ii)的pH值调至6.5；

(iv) 按指定的顺序在每次添加后使其pH值调至6.5的溶液(iii)中一次性溶解下列维生素：

泛酸钙 0.1克

烟酸	0.1 克
肌醇	2.5 克
盐酸硫胺素	0.1 克
吡哆醇	0.1 克
对氨基苯甲酸	0.02 克

(v) 加入总量为 100 毫升的水;

(vi) 像前面那样把 pH 值调至 6.5;

(vii) 经过无菌过滤后再把其分为 5 至 10 毫升的不同等份并储存在冰箱里。

痕量元素 (100 毫升):

(i) 在 50 毫升水中溶解 1.5 克 的 EDTA 钠;

(ii) 在溶液 (i) 中加入 0.45 克四水硫化锌;

(iii) 溶液 (ii) 通过每次添加以下物质使其 pH 值调至 6.0:

二水氯化锰	0.1 克
六水氯化钴	0.03 克
五水硫酸铜	0.03 克
二水高锰酸钠	0.04 克
二水氯化钙	0.45 克
七水硫酸铁	0.3 克
硼酸	0.1 克
碘化钾	0.01 克

(iv) 添入总量为 100 毫升的水;

(v) 把 pH 值调至 4.0;

(vi) 经过无菌过滤后再把其分为 5 至 10 毫升的不同等份并储存在冰箱里。

麦角固醇/吐温^{MT}80 溶液 (200 毫升):

(i) 在 64 毫升煮沸的纯乙醇中溶解 1.5 克的麦角固醇;

(ii) 在溶液中加入 67.2 克吐温^{MT}80 并通过加入纯乙醇把该溶液容量调至 200 毫升;

(iii) 进行无菌过滤。

1.1.6. 酶促水解

酶促水解是在 1 升液体总量为 500 毫升的浸制瓶里完成的。在接下来的发酵处理过程中，为了给微生物提供最佳的生长条件（在同样的瓶中进行），湿法氧化的麦草（以下有时也被称为 WOS）与 BA 介质中的各种成分混合，混合以用 WOS 液体来替代在准备 BA 介质所利用的去离子水的方式进行。每个瓶子都用一个橡皮隔膜和一个铝制密封圈来密封并使该瓶在 120 摄氏度的温度下进行高温消毒一个小时。接下来在厌氧无菌条件下用皮下针插入橡皮隔膜加入或者抽出瓶中的物质。

为了酶促水解，3.5 毫升的 Celluclast™ 1.5 升（丹麦巴格斯瓦市的诺和诺德公司应其要求提供了 Celluclast™ 详细资料的手册供参考）每 500 毫升 WOS 被加入瓶中并在 pH 值为 6.1 和温度为 40 摄氏度的条件下培养 9 天。

1.1.7 糖类发酵

在经过水解处理以后，酵母提取物、其它维生素、痕量元素以及麦角固醇/吐温^{MT}80 溶液加入瓶中以提供在发酵过程中糖类发酵微生物（即啤酒糖酵母和迈氏热厌氧杆菌 A3M4）最佳的生存条件。

微生物：酵母 啤酒糖酵母（一种嗜温微生物）用来发酵葡萄糖。啤酒糖酵母的细胞从一包面包酵母的中心取出并使装有附加 YM 介质的 20 毫升血清瓶在 30 摄氏度的温度下培养 24 个小时。在经过培养之后，培养基在 5 摄氏度的温度下被储存起来直到菌落被拿出用于发酵实验。

木糖的发酵通过一系列嗜热菌迈氏热厌氧杆菌，即迈氏热厌氧杆菌 A3M4 (Ahring 等 1996) 来完成的。

发酵过程：把啤酒糖酵母加入到瓶中并在 30 摄氏度的温度下培养 14 天，然后加热此瓶至 70 摄氏度，加入迈氏热厌氧杆菌 A3M4 并使此瓶在 70 摄氏度的温度下培养 10 天。为了监控其发酵过程，瓶内的压力要每天用压力计来测量。当瓶内的压力稳定时，发酵过程就会由微生物来完成。为了分别确定挥发性脂肪酸(VFA) 的成分、乙醇成分及整个糖类成分（通过标准方法），在酵母发酵与 A3M4 发酵完成后，样品即被取

出。

在发酵过程完成以后取出适量的样品，打开瓶口并使各种成分[发酵后的经湿法氧化处理后的草 (FWOS)]以 13200 x G 并在 4 摄氏度的温度下被离心分离出来（以成批的形式），这样就会除去尚未降解的草和其它悬浮物质。把来自于不同批离心分离出来的上清液集中起来搅拌倒入容量为 1 升的塑料瓶中并在零下 20 摄氏度的温度下冷冻储存起来；这个上清液相在下文有时也被称为 FWOS_s。把来自于不同批离心分离出来的沉淀物（粒状沉淀）用同样的方式进行处理（产生 FWOS_p 的产物）。

1.1.8 “上流式厌氧污泥床” (UASB) 反应器实验

这些实验由容量为 200 毫升的实验室规模的玻璃反应器来完成，图 3 阐述了该反应器的具体结构。反应器 per se 通过被热罩包裹就可以使恒温水浴中的水通过它被环流。该实验利用水温为 37 摄氏度的水。一个通入反应器并穿过热罩下部的入流管，包括一个螺旋部分 2。该螺旋部分可以避免固体生物物质[包含在本明步骤 (VI) 的工艺中合成甲烷的厌氧有机体] 由于待处理来料迅速被暴露在的达到热罩中介质的实际温度而造成的温度休克。位于反应器底部入口处的密封球 3 的作用相当于一个不可转动阀门，阻挡反应器内部物质通过入口管而泄漏出来。反应器系统作为一个整体与 12 毫米氯丁二烯橡胶相隔离。

把离开反应器的废液（处理后的物质）收集在一个媒介储存容器中，把其中的废液与待处理的新材料按 4: 1 的比例回流到反应器当中。用一个装有不同直径泵管（即具有不同的抽吸容量）的蠕动泵（Waston-Marlow）把回流处理后的材料以及新加入的材料抽出来并确保回流材料与新加材料的连续比例而不用考虑蠕动泵的转速。

反应器顶部装有可以直接从反应器出口处抽取气体或液体样本的管子 4。位于反应器上部的一个孔口为 1 毫米的网筛 5 可以阻止悬浮的固定的生物物质从反应器中被冲洗出来。

这些实验所利用的固体生物物质（颗粒体）是由荷兰的 EerbeekBV 公司提供并从用于净化造纸厂废水的嗜中温完全规模的反应器中提取出来的。本实验中的生物物质储存在反应器 5 摄氏度的温度中为最佳。

如果反应器流出来的废液气压超出了流进该反应器的气压，里面的气体和液体就会分开。气压的体积可以用基于液体转移原理的测量表（Angelidaki 等.,1992）来测量。分离出来的气体可以不用收集。用来确定反应器中所产生气体成分的气体样品可以在反应器顶部的液体平面上方用抽气管 4 迅速抽取出来。这样做是因为废液容器中也会产生甲烷产物。

在开始使用反应器以前，要把脱氧 BA 介质装入反应器系统中。把 100 毫升的固体生物物质引入到反应器当中并加入 3 毫升硫化钠（25 克/升）以减少反应器中存在的氧气。为了避免固体生物物质的抑制性，反应器在开始使用时要用 BA 介质把 FWOS_S 稀释至 25%（v/v）（看下面）并把其滞留时间定为每天 100 毫升。微生物在生物物质中的适配性可以首先通过测量反应器顶部 VFA 的浓度进行监控。一旦 VFA 成分得到了稳定，新进材料 FWOS_S 的浓度就会以每次递增 20%（相对的）的速度而最终获取升至 100%FWOS_S。同样，根据 VFA 的浓度使其滞留时间逐渐减少直到反应器中的滞留时间达到每天 200 毫升。

反应器开始时及操作过程中 FWOS_S 准备：把待处理材料放在 1 升与抽吸管一起经过高温消毒的浸制瓶中准备好。FWOS_S 的稀释液是通过用 BA 介质把其浓度稀释到理想状态；加热温度至 85 摄氏度使 FWOS_S 融解并把乙醇除去。使该液体在回流以减少其蒸发条件下用空气吹脱 4 个小时。在除去乙醇过程中每间隔一段时间测量一次剩余浓度；当液体乙醇的剩余浓度为 5 至 10mM 时，蒸发即停止。通过其重量的减轻与去离子（Milli-Q™）水的增加所代替的失去的液体容积可以估计出其蒸发的程度。把去掉乙醇后用 BA 介质稀释过的 FWOS_S 进行无菌过滤穿过 0.2μm 的过滤器后进入一个经过高温消毒后的浸制瓶。然后，瓶内的成分在经过 80/20（v/v）的氮气/二氧化碳的气体混合物吹脱 15 分钟后使其脱去氧气。为了确定 VFA、乙醇成分、化学需氧量（COD）以及氮气含量，在无菌条件下把 40 毫升的样品提取出来并测定其 pH 值。用一个新瓶来代替几乎空了的浸制瓶并把新瓶中的剩余介质提取出来进行分析。把浸制瓶中的样品取出来在零下 20 摄氏度的温度下储存以备分析。

监测：在反应器的起始和接下来的操作过程当中，除了要把VFA等级测出来，还要把气体产物、气体成分以及COD的降低也测出来。除此以外，在经过至少4个最大有机负荷的滞留期后，把样品从反应器顶部的入口处取出作气相层析以测定不同芳香族混合物的降解程度。把样品储存在零下20摄氏度的温度下以备分析。

分析方法：按照Greenberg等，1992. 测定干燥物质、有机物质、COD和凯氏氮。用FID检测器进行气相层析来测定其甲烷浓度。用热传导检测器进行气相层析来测定反应器中产生的生物气体中的氮气、二氧化碳以及甲烷的浓度。

用FID检测器进行气相层析来测定乙醇和VFA的浓度（醋酸盐、丙酸盐、丁酸盐、异丁酸盐）；通过加入每毫升30 μ l的磷酸（17%）样品使其酸化并以每分钟11000转的转速进行离心分离10分钟来测定VFA。

用固相提取及FID检测器进行气相层析来测定像芳香族化合物以及相关假芳香族化合物这类微生物（比如糖类发酵微生物）的抑制剂如2-呋喃甲酸、苯酚、香草酸、高香草酸、加拿大麻素、4-水杨酸以及其它酸类；固相提取在pH值为2至7的条件下进行。

整个糖类在经过水解后的以标准方式用强酸（72%硫酸）来进行测定；然后，还原糖的浓度以木糖作为校准物并由著名的二硝基水杨酸（DNS）法来进行测定。

钾、硝酸氮以及磷酸P的标准在丹麦商业种植协会（“Dansk Erhvervsgartnerforening”）来测定。

1.2 结果

1.2.1 糖类发酵结果

在上面提到过的麦草的湿法氧化预处理中，所利用的草的浓度为每升水60克干草，这与理论上干燥物质成分在重量上（w/w）要占6%相符。在实施发酵实验以前，样品被取出对WOS进行分类测定。结果如下：

图表 1.1. 用于发酵实验中 WOS 的分类测定

整个糖类*	31.8±0.5 克/升
干燥物质	55.4±0.9 克/升
有机质	44.5±0.9 克/升
PH 值	7.3±0.2
化学需氧量**	61.4±1.6 克/升
凯氏氮**	0.12±0.01 克/升
醋酸	2.0±0.1 克/升

*根据强酸水解和木糖为标准来确定的。

**标准偏差是根据两次测量值来确定的。

尽管明显产生了醋酸，但是由于其浓度太底而不能引起有效的酵母抑制，(1997 年的 Taherzadeh 等)指出酵母只有在 pH 值为 4.5 醋酸浓度达到每升 10 克的浓度时才能生长。

根据 WOS 中的葡萄糖与木糖成分为基础，“理论上的”(化学计量的)乙醇的产量可以像下面这样计算出来：



每克糖所产生的乙醇量用克表示与其“在理论上的”每克葡萄糖产 0.51 克乙醇，每克木糖产 0.51 克乙醇相符。起始糖类总量的浓度为 31.8±0.5 克/升(表 1.1)与其理论上每升 WOS 产生的乙醇最大量 16.2±0.3 克相符。

表 1.2 展示了用二种糖类发酵微生物在经过 WOS 发酵后的平均乙醇浓度

表 1.2. 在麦草湿法氧化(WOS)发酵过程中乙醇的合成

	啤酒糖酵母 的发酵		迈氏热厌氧杆菌 A3M4 的发		总量 克/升
	克/升	总量百分比	克/升	总量百分比	
平均值	5.3±1.0	94%	0.3±0.2	6%	5.6±1.0

表 1.2 的结果与理论上乙醇产量的对比显示了在本实验的 WOS 中大约糖类总量的 35% 转化为乙醇。以这种方式产生的乙醇(生物乙醇)如

前面所述可以被分离出来用来作为燃料、溶剂或用于其它用途。

1.2.2 UASB 反应器中有机物的降解

表 1.3 展示了用 4 种 FWOS_s 的不同样品(指 R1-R4)在经过实验室规模反应器 70 多天的处理后所得到的结果。

表 1.3 用 4 种不同经过发酵与湿法氧化后的麦草(FWOS_s)的样本在实验室规模的反应器中处理后得到的结果

样本	取样时间	滞留时间	流 量	入口 COD 含量	出口 COD 含量	COD 减少量
	(天)*	(天)	(毫升/天)	(克/升)	(克/升)	(百分比 w/w)
R1	76	2.0	100	27.2	4.5	84
R2	102	1.3	159	25.7	4.9	81
R3	107	1.0	200	26.7	5.7	79
R4	110	1.0	200	28.9	5.4	81

*天数从反应器开启后开始计算

从表中可以看出反应器中有机质的降解(用 COD 的减少量来表示)并不受以进入时 COD 含量(以克/升表示)之间的比例与滞留时间(以天数表示)来表示的有机物负荷(从 R1 到 R4)翻一倍的影响,这个比例在以下指 OLR。

反应器中气体(沼气)的发展也处于监控中。在经过大约 60 天(53 到 110 天)对反应器的操作使其转化的一系列测量中,每天产生出来的生物气体含量与 OLR 的紧密关系得到观测。因此,每天每个引入反应器的 COD 单位(例如:克 COD/升/天)所产生出来的生物气体含量(升/天)大约为 0.1。所产生气体当中的甲烷成分在实验中不断的产生出来,平均为 $58.6 \pm 0.8\%$ (v/v) 的甲烷。

1.2.3 微生物抑制物质的降解

为了研究不同种类产甲烷微生物的潜在抑制物的芳香族或假芳香族物质的降解,在 UASB 反应器处理前和处理后对与表 3 有关的样品 R1-R4 的一些物质浓度进行了分析。

表 1.4 UASB 净化步骤中抑制物质的清除

抑制物	入口 (ppm)	出口 (ppm)	减少量 (%)
2-呋喃甲酸	5.61	0.00	100
4-水杨醛	3.46	0.35	90
4-水杨酸	15.72	0.4	97
香草酸	60.74	0.62	99
高香草酸	25.08	0.69	97
丁香酸	45.53	0.00	100
丁香醇	7.43	0.96	87
乙酰香兰酮	5.40	1.13	79
乙酰丁兰酮	28.11	0.97	97

如图表 1.4 所示, 香草酸、高香草酸、乙酰香兰酮的平均起始浓度分别为大约 60ppm、大约 25ppm 和大约 5ppm。在反应器中经过处理以后, 这三种类型的浓度减少到接近于或低于进行分析的识别底线 (1-2ppm)。丁香酸、乙酰丁兰酮及丁香醇也可

获得同样的结果, 其平均起始浓度分别为大约 45ppm、大约 28ppm 和大约 7ppm, 在反应器中经过处理以后, 其浓度也达到接近于或低于 1--2ppm 的分析识别底线。

很明显, 这种反应器类型通过本发明工艺中液相回流的再利用进行的厌氧过程能够使物质的降解 (I) 达到很高的程度, 否则的话就会导致这种方式所描述的糖类发酵的抑制, 并且进入反应器中的物质中的 COD (通常为有机质) 在很大程度上会被除去 (II) 以及可利用的生物气体也会形成, 比如, 以燃料的形式存在。

上面所描述的实验及其结果充分说明了本发明工艺方案的可行性及有效性。

尽管上面的例子所描述的是用湿法氧化法对木质纤维素生物物质进行预处理, 但本发明也可以采用蒸气爆炸法进行预处理。表 1.5 所示的是对湿法氧化的麦草 (WSWO) 和蒸气爆炸的麦草 (WWSE) 在经过乙醇发酵后的水解产物中理论甲烷势的计算。

以上这些计算的根据如下: 麦草的起始含量为 60 克每升。经过湿法氧化处理的麦草的 COD/TS 关系和 COD 去除率由丹麦技术大学生物中心 (BioCentrum, DTU) 确定。经过和蒸气爆炸处理的麦草的 COD 去出

率是在丹麦技术大学生物中心 (BioCentrum, DTU) 通过批式反应试验测得。比甲烷产量, 木糖与半纤维素的关系, 葡萄糖与纤维素的关系是化学平衡的固定值。糖的组成和回收率由丹麦瑞索国家实验室(Risø National Laboratory)确定。

计算甲烷产量所根据的是乙醇发酵后仍可以转化为甲烷的剩余 COD 的量和表 1.5 所确定的转化产率。根据糖的产率可以计算乙醇发酵后 COD 的损失量, 这一部份应该从水解产物的 COD 总量中减去。甲烷的产量就可以根据剩余 COD 和已经确定的 COD 转化率和比甲烷产率来计算。

表 1.5 理论甲烷势的计算和假定

进 料	WSSE	WSWO	单位
水解产物			
水解产物中麦草的浓度	60	60	克/升
COD/TS-关系	1.1	1.1	克/升
预处理后 TS 的损失量	2%	8%	克/升
COD 的转化程度	82%	85%	克/升
比甲烷产量	0.35	0.35	升-CH ₄ /-COD
麦草中半纤维素的含量	28%	28%	克/升
麦草中纤维素的含量	37%	37%	克/升
半纤维素的回收率	60%	70%	克/升
半纤维素的回收率	90%	80%	克/升
葡萄糖与纤维素的关系	1.11	1.11	克/升
木糖与半纤维素的关系	1.14	1.14	克/升
计算			
葡萄糖产量	22.2	19.7	克/升
木糖产量	11.5	13.4	克/升
COD 损失(转化为乙醇的糖类)	36	35	克-COD/升
水解产物中的初始 COD	65	61	克-COD/升
用于生产甲烷的剩余 COD	29	25	克-COD/升
甲烷产量	8.28	7.58	升-CH ₄ /升-水解产物
比甲烷产量	138	126	米 ³ -CH ₄ /吨-麦草

实施例 2

木质纤维素物质湿法氧化法降解产物的评估

2.1 简介

这个例子展示的是对糖产率以及木质纤维素物质湿法氧化法降解产物的定性和定量的研究，并且对纤维素和半纤维素分离的评估。

2.2 实验的总结

麦草的湿法氧化通过 4 个参数的 8 种组合来进行的：温度、时间、碳酸盐和氧气。其中的两个实验在从固体部分中获得半纤维素和木质素的溶解方面占优势，半纤维素的回收率高达 52.0–56.5%，纤维素高达 99.7–99.8%。固体部份包括 67.5–65.8%的纤维素，7.6–10.4%的半纤维素，4.8–5.6%木质素。从纤维素到葡萄糖的酶转化能力为 62.1–67.7%。液体部份包括可溶的半纤维素和低分子量的降解产物，例如羧基酸、单体酚、呋喃。固体和液体部份中的降解产物与湿法氧化的具体条件有关：反应时间，温度和所加入的碳酸盐和氧气的量。碱性湿法氧化，例如加入氧气和碳酸盐，对于固体部份中的木质素和半纤维素的溶解很重要。固体部份中的木质素的含量越低，纤维素的酶转化率就越高。

2.3 材料与amp;方法

2.3.1 材料

所选用的是一九九七年在瑞索国家实验室种植并收获的一种叫做 Husar 的麦子 (小麦属 *aestivum* L.)。麦草干燥后被剪至 5 毫米。溶剂和化学药剂都是从 Fischer, Merck, Aldrich 和 Fluka 购买的，并且都是分析纯的。

2.3.2 湿法氧化预处理

湿法氧化是在与前面所描述的相同的环路反应器中完成的。在提高氧的压力和加热前，将 60 克的麦草与 1 升水和碳酸钠混合。在大约冷却至 25–30 摄氏度时，再将预处理后的麦草通过过滤分为固体纤维部份和液体部份。

2.3.3 固体纤维部份的分析

在 20 摄氏度和 65%的相对湿度时，将固体部份干燥至恒重。根据 Goering 和 Soest(1970)，分析固体部份的纤维素、半纤维素、木质素和

无细胞壁物质(NCWM)的含量。

从纤维素到葡萄糖的酶转化能力是通过 Celluclast 和 Novozym188 (两者都来自 Novo Nordisk, Bagsvaerd) 纤维素酶的混合物来确定的 (Schmidt and Thomsen, 1998)。

2.3.4 液体部份的分析

滤液在被随即加以分析其 pH 值, 总有机碳(TOC)和呋喃后, 被冷冻贮藏(零下 20 摄氏度) 以便用于进一步分析。总有机碳是在 680 摄氏度燃烧后(以铂做催化剂), 用 IR 探测在 Shimadzu TOC-5000 上测得的。无机碳的补偿是采用盐酸酸化实现的。5-羧基-2 甲基糖醛(5-HMF) 和 2-糖醛是通过使用可靠的化合物作为校正标准, 在 pH 值为 3 时, 用甲醇线性梯度洗提液(10-90%)的高压液体层析(Nucleosil 5C-18, 25 毫米柱高)对新鲜滤液进行分析来确定的 (Bjerre 等, 1996a)。半纤维素是作为葡萄糖, 木糖和阿拉伯糖等溶解糖, 在经过硫酸水解, 过滤, 以及离子交换提纯后, 在 63 摄氏度时用 4 毫摩尔的硫酸作为洗提液, 以每分钟 0.6 毫升的流量的高压液体层析 (Aminex HPX-87H) 来确定的 (Bjerre 等, 1996b)。梭基酸是通过 Dionex4000iIC 系统的离子层析 Ionpac ICE-AS-6 柱和 0.4 毫摩尔庚氟基丁酸作为洗提液在 1.0 毫升每分钟用联合传导率和 UV (204nm) 检测来确定的。草酸是通过使用同样的系统来确定的, 但是使用的是 AS12A 柱, 流量为 1.5 毫升每分钟的 2.7 毫摩尔的碳酸钠和 0.3 毫摩尔的碳酸氢洗提液。

2.3.5 液体部分中酚的分析

在 4 摄氏度时, 将液体部分或发酵液以每分钟 10, 000 转的转速离心分离 10 分钟。用 1 摩尔的氢氧化钠和 1 摩尔的盐酸将上清液的 PH 值分别调至 6.9--7.1 和 1.9--2.1。在 pH 值为 6.9--7.1 的状态下, 通过固相提取把酚和呋喃甲酸从液体部分中分离出来, 然后分别用乙酸乙酯 (Isolute ENV+100mg/1mL.IST) 进行洗提。酚醛和酚酮通过 PH 值为 7 的提取液来定量的。酚酸和 2-呋喃甲酸是通过分析 pH 值为 2 的提取液中的三甲基硅烷衍生物来定量的。pH 值为 7 的提取液的样品是用乙腈稀释的。pH 值为 2 的提取液是用乙腈稀释并用硫酸钠干燥的。在 70 摄氏

度时，用 BSTFA(N,O-Bis(三甲基硅烷) 三氟乙酰胺和乙腈(1:5) 将上清液烷基化 30 分钟。酚类是用可靠的标准，通过 DC-MS 和 GC-FID，在带有 0.25 微米的苯基交叉键的熔合硅毛细管(HP-5, Agilent Technologies, USA 或 XTI-S, Restek Corp., USA) 上分析来定量的。

2.4 结果与讨论

湿法氧化

本研究是通过 8 个实验(2^{4-1} 因子设计) 来优化麦草(60 克/升) 硷性湿法氧化的产糖率和对纤维素和半纤维素的分离的。温度、反应时间、碳酸钠和氧气是在两种不同程度下测定的反应参数(见表 2.1)。湿法氧化法获得的水解产物通过过滤被分成两部分：液体可溶部分和固体纤维部分。液体部分包括单体酚、羧基酸和呋喃等半纤维素产物，而固体部分包括纤维素、半纤维素、木质素和无细胞壁物质。

表 2.1 应用湿法氧化加工麦草的统计 2^{4-1} 因子设计 (60 克/升麦草)。

因子	参数	低水平	高水平	单位
A	温度	185	195	摄氏度
B	碳酸钠	6.5	2	克/升
C	氧气	6	12	$\times 10^5$ 帕斯卡
D	反应时间	10	15	分钟

至于起始原料—麦草，其固体纤维部分包括 84--95.9%的纤维素，5.5--45.5%的半纤维素，28.1--67.5%的木质素，以及 25.9--44.7%无细胞壁物质。当固体部分的纤维素含量高，木质素含量低，并且酶的转化能力很高的时候，实验的状态为最佳。此时纤维素和半纤维素的回收率也很高。在所有的实验当中，纤维素的回收率均高于 90%，但是半纤维素的回收率从 42%到 70%不等。因此在其中的四个实验当中，纤维素和半纤维素的分离率很高，并且纤维素转化为葡萄糖的效率也很高。但是有关糖的回收，在湿法氧化状态下只有两个实验为最佳：反应在加入 12×10^5 帕斯卡氧气和 6.5 克/升碳酸钠后分别在 185 摄氏度下进行 15 分钟及在 195 摄氏度下进行 10 分钟。可溶解糖的总量不会改变太多，也不会因为固体部分中半纤维素的减少而改变。

经过湿法氧化处理后的麦草的可溶部分由可水解糖 (7.1--9.2 克/升)、羧基酸(1.9--7.2 克/升)、酚 (大约 0.14--0.20 克/升) 和呋喃(0--0.09 克/升) (见表 2.3) 。主要的酚类包括香草醛、丁香醛、乙酸丁香酮(4-羟基-3,5-二甲基苯乙酮)、香草酸和丁香酸, 它们的浓度在 10--90 毫克/升范围内。在加热和酸性条件下, 木糖将会分解为 2-糖醛, 葡萄糖将会分解为 5-HMF。当加入少量的碳酸盐时, 实验就会产生这两种呋喃, 当加入多量的碳酸盐时, 则不能。在 195 摄氏度和 12 巴的氧气条件下, 加入 2 克/升碳酸盐并反应 15 分钟时, 实验产生大量的呋喃, 此时的 PH 值也最低 (见表 2.3) 。结果表明, 糖的降解产物 2-糖醛和 5-HMF 在加入少量的碳酸盐、高温、长反应时间进行预处理时, 更容易获得。其中, 碳酸盐是最重要的因素。

所有的实验的羧基酸的产生量都很高, 甲酸和乙酸为主要的羧基酸类。羧基酸的形成与固体部分中的半纤维素和木质素的去除有关(见表 2.2 和 2.3)。因此, 羧基酸的产生看上去为木质和半纤维素降解的结果(Bjerre 等, 1996) 。许多不可挥发的羧基酸是通过用 GC-MS 分析其冻干的液体部分中的三甲基硅烷的衍生物来鉴别的, 例如琥珀酸、乙醇酸、乳酸、苹果酸、马来酸、延胡索酸、2,3-二羟基丙酸和 2,4-二羟基丁酸。

表 2.2 化学成分、可溶解糖、可转化纤维素和经过湿法氧化后的麦草中的糖类回收物(60 克/升)

起始物或反应物	温度: 时间: 氧气压力: 碳酸钠:	185 摄氏度 10 分钟 6×10 ⁵ 帕斯卡 6.5 克/升	185 摄氏度 10 分钟 12×10 ⁵ 帕斯卡 2 克/升	185 摄氏度 15 分钟 6×10 ⁵ 帕斯卡 2 克/升	185 摄氏度 15 分钟 12×10 ⁵ 帕斯卡 6.5 克/升	195 摄氏度 10 分钟 6×10 ⁵ 帕斯卡 2 克/升	195 摄氏度 10 分钟 12×10 ⁵ 帕斯卡 6.5 克/升	195 摄氏度 15 分钟 6×10 ⁵ 帕斯卡 6.5 克/升	195 摄氏度 15 分钟 12×10 ⁵ 帕斯卡 2 克/升
固体部分	(克)	31.7	38.2	36.3	30.5	36.2	29.3	28.4	28.6
NCWM	(% w/w)	13.9	17.1	16.1	14.7	18.6	15.7	13.7	21.8
半纤维素	(% w/w)	13.8	20.0	14.7	10.4	12.3	7.6	8.0	3.2
木质素	(% w/w)	8.4	8.0	9.0	4.8	9.7	5.6	7.7	7.1
纤维素	(% w/w)	61.8	53.5	58.6	67.5	58.0	67.8	67.4	65.1
转化能力	(% w/w)	53.7	38.1	38.1	62.1	39.3	67.7	63.2	66.3
液体部分									
葡萄糖	(克/100 克)	3.6	4.3	4.0	2.9	3.8	2.6	2.8	3.2
木糖	(克/100 克)	8.7	6.3	8.7	9.6	10.2	9.9	10.1	10.5
阿拉伯糖	(克/100 克)	2.0	1.3	1.6	2.3	1.5	2.3	2.5	1.0
总糖	(克/100 克)	14.3	11.9	14.2	14.8	15.5	14.8	15.4	14.7
PH	-	7.7	4.7	4.8	6.0	4.7	5.9	6.1	3.8
回收率									
半纤维素	(%)	59.2	69.6	64.1	56.5	63.6	52.0	53.2	41.6
纤维素	(%)	94.3	102.4	105.7	99.7	103.9	99.8	93.3	91.7
总量	(%)	79.2	88.3	87.8	81.2	86.5	76.9	76.1	70.1

表 2.3 经过湿法氧化处理麦草(60克/升)的液体部分中化合物的定量(克或毫克/100克-麦草)

种类	化合物	温度: 时间: 氧气压力: 碳酸钠:	185 摄氏度 10 分钟 6x10 ⁵ 帕斯卡 6.5 克/升	185 摄氏度 12 分钟 12x10 ⁵ 帕斯卡 2 克/升	185 摄氏度 15 分钟 6x10 ⁵ 帕斯卡 2 克/升	185 摄氏度 15 分钟 12x10 ⁵ 帕斯卡 6.5 克/升	195 摄氏度 10 分钟 6x10 ⁵ 帕斯卡 2 克/升	195 摄氏度 10 分钟 12x10 ⁵ 帕斯卡 6.5 克/升	195 摄氏度 15 分钟 6x10 ⁵ 帕斯卡 6.5 克/升	195 摄氏度 15 分钟 12x10 ⁵ 帕斯卡 2 克/升
糖类	葡萄糖 (克/100克)		3.56	4.26	4.01	3.75	2.57	2.84	3.23	3.23
酸类	木糖 (克/100克)		8.71	6.31	8.66	10.19	9.94	10.06	10.51	10.51
	阿拉伯糖 (克/100克)		2.04	1.33	1.56	1.51	2.32	2.52	0.98	0.98
	甲酸 (克/100克)		2.19	3.61	0.72	3.04	5.77	6.22	6.45	6.45
	乙酸 (克/100克)		1.92	1.68	1.52	1.61	2.12	2.60	2.27	2.27
	乙醇酸 (克/100克)		0.49	0.58	0.59	0.73	1.45	2.02	1.16	1.16
	乳酸 (克/100克)		0.43	n.d.*	0.17	0.22	n.d.	3.29	n.d.	n.d.
	草果酸 (克/100克)		0.10	0.21	0.19	0.17	0.27	0.24	0.23	0.23
	柠檬酸 (克/100克)		0.07	0.00	0	0	0.03	0.07	0.07	0.07
	草酸 (克/100克)		0.03	0.01	0.01	0	0.01	0.01	0.01	0.01
	琥珀酸 (克/100克)		0.83	0.26	0.24	0.25	0.38	0.47	0.41	0.41
呋喃类	5-羟甲基糠醛 (毫克/100克)		0	0	0	0	0	0	15	15
酚类	2-糠醛 (毫克/100克)		0	3	0	32	0	0	135	135
	2-呋喃甲酸 (毫克/100克)		0	3	5	6	11	7	16	16
	酚 (毫克/100克)		2	1	1	1	5	2	8	8
	愈创木酚 (毫克/100克)		17	3	6	9	19	32	5	5
	丁香酚 (毫克/100克)		15	1	5	6	6	13	5	5
	4-羟基苯甲醛 (毫克/100克)		12	35	36	39	35	25	55	55
	香草醛 (毫克/100克)		7	59	66	74	54	28	89	89
	丁香醛 (毫克/100克)		1	23	35	50	41	3	69	69
	4-羟基苯乙酮 (毫克/100克)		2	3	4	5	7	6	8	8
	加拿大麻素 (毫克/100克)		6	7	8	10	15	14	14	14
乙酸丁基酯 (毫克/100克)		45	40	46	56	65	70	66	66	
4-羟基苯甲醚 (毫克/100克)		1	10	6	4	16	6	11	11	
香草酸 (毫克/100克)		3	39	37	28	112	40	78	78	
丁香酸 (毫克/100克)		5	12	23	28	37	48	46	46	
p-香豆酸 (毫克/100克)		12	18	24	24	18	6	12	12	
阿魏酸 (毫克/100克)		8	5	12	16	17	6	14	14	
总量			20.49	18.52	17.97	21.86	25.31	30.63	25.97	25.97

除了 4-羟基-3-甲氧基苯酚乙二醇以外,没有发现带有脂肪醇的苯类。硅烷的提取物当中,有些化合物可以被鉴定。例如 酚、愈创木酚、丁香醇、4-羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛、2-呋喃甲酸、4-苯甲酸、香草酸、丁香酸、P-香豆酸、阿魏酸和 4-羟基-3-甲氧基苯酚乙二醇可以通过物质光谱和(可能时)可靠标准类证明。由于酚酮类的酮-烯醇异构化作用和用 BSTFA 对 TMS-乙醚处理时而形成烯醇, SPE 提取物在 pH 值为 7 时,通过 GC-MS 进行无衍生化分析。因此,4-羟基乙酸酚、乙酸香草酮和 4-羟基-3,5-二甲基乙酸酚可以被鉴定出来。3,4,5-三甲基-乙酸酚和 3,4,5-三甲基苯甲醛不能被鉴定出来。

如果在下列条件下比较两个实验,就会有重要的发现:在低水平和高水平时分别加入氧和碳酸盐,在 195 摄氏度时反应 10 分钟。当在高水平时加入氧气和碳酸盐,固体部分中的半纤维素和木质量素成分就会很低,而在低水平时加入氧气和碳酸盐,固体部分中的半纤维素和木质量素成分就会很高(见表 2.2)。酚类的总含量大致相同,但是在加入大量的氧气和碳酸盐时,羧基酸的总含量也非常高。这表明在湿法氧化过程中,酚类在某种程度上转化为羧基酸。像酚和喹啉等典型的芳香族化合物在湿法氧化过程中会产生大量降解为羧基酸的物质。

实施例 3

木质纤维素生物物质转化过程各个步骤中潜在的抑制物的评估

3.1 材料与方法

3.1.1 预处理--湿法氧化

湿法氧化(WO)是在建在瑞索国家实验室(Risø National Laboratory)中的 2-L 环路反应器中进行的(Bjerre 等,1996)。发酵物的预处理条件为 195 摄氏度,6.5 克/升碳酸钠和 12×10^5 帕斯卡的氧气,反应时间为 10 分钟。在增加氧气的压力和加热悬浮物之前,将磨碎的麦草(5mm)(60g)与 1 升水和碳酸钠混合。将全部预处理的麦草泥浆冷却至 30 摄氏度以下后,再将其从反应器中吸出。麦草的成分用如前所述的方法鉴别(Ahring 等,1996)。经过预处理的麦草由 34.6 克/升纤维素组成,其中 20.8 克/升可以通过 CelluClas[®]和纤维素酶 Novozymo 188 的混合物被转化为葡萄

糖(67%酶转化率) (Schmidt 等, 1998) , 这些酶由丹麦的诺和诺德公司 (Novo Nordisk A/S, Denmark) 提供。经过湿法氧化后没有发现单体木糖。在用(Ahring 等, 1996) 描述的方法用弱酸对麦草进行水解预处理时, 单体木糖的浓度为 6 克/升。

3.1.2 酶促水解

如前面所示((Ahring 等, 1998) , 经过 CelluClast[®]处理的半纤维素水解酶可以获得更多的半纤维素基质。因此, 用迈氏热厌氧杆菌 A3 可以大大提高乙醇的产量。在经过湿法氧化处理后的麦草介质中, 在高温消毒之前把 pH 值调至 7.0。然后向该介质中加入 1 % v/v CelluClast[®] (相当于 17.5 FPU/克 纤维素, FPU 为 Filter Paper Units 缩写, 意思为滤纸单位) 。CelluClast[®]是一种源于 *Trichoderma reesei*. 可以购买到的广泛的天然的纤维素酶。将该混合物在 40 摄氏度和 pH 值为 7.0 的条件下培养 24 小时。

3.1.3 乙醇发酵--所用的微生物和介质

迈氏热厌氧杆菌 A3M4

根据(Sonne-Hansen 等, 1993) 的描述, 该实验所用的 迈氏热厌氧杆菌 A3 的变异菌株最初是从冰岛的温泉中分离出来的。(Larsen 等, 1997) 对迈氏热厌氧杆菌 A3M4 曾经进行过描述。所有发酵均在 70 摄氏度和 pH 值为 7.0 的条件下进行的。A3M4 大致可以如(Ahring 等, 1996) 所描述的那样获得。

啤酒糖酵母

面包酵母可以从丹麦酒精制造厂(The Danish Alcohol Producer) 购得。酵母细胞取自成套试剂的内部, 转移到一个 20 毫升盛有 YM 的血浆瓶中, 培养 24 小时后涂在培养皿的标准琼脂糖上面。所有的酵母培养均在 30 摄氏度和 pH 值为 6.0 的条件下进行。

啤酒糖酵母介质

以下为基本的酵母介质 (YM) 成分: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0 克/升、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 克/升、 KH_2PO_4 3.0 克/升。维生素 0.050 毫克/升、泛酸钙 1.0 毫克/升、肌醇 25.0 毫克/升、维生素 B₁ 1.0 毫克/升, 维生素 B₆ 1.0

毫克/升、对氨基苯甲酸 0.2 毫克/升。痕量金属 EDTA 15.0 毫克、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 4.5 毫克、 $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.0 毫克、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.3 毫克、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.3 毫克、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.4 毫克、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 4.5 毫克、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.0 毫克、 H_3BO_3 1.0 毫克、KI 0.1 毫克。麦角固醇 10 毫克/升、吐温 80 84 毫克/升。在高温消毒前，将介质用 N_2/CO_2 (4:1) 气体吹脱 20 分钟，并将 pH 值调至 6.0。

原液溶液

将维生素和痕量金属溶液按照 1000x 原液准备好。将麦角固醇和吐温 80 按照溶解在 96% 乙醇中的 1250x 原液准备好。将所有用 N_2/CO_2 (4:1) 气体吹脱 20 分钟，并在高温消毒后无菌过滤添加。

在培养时，选择新生的菌落并转移到盛有 YM 的血浆瓶中，该瓶为密封状态，在一个水平的搅拌器上以每分钟 200 转的转速，在 30 摄氏度时培养一夜。将培养了一夜的 10% 的培养物转移到厌氧 YM 中并再培养一夜。将该培养物作为接种物用于发酵实验。用于接种的瓶的光密度 OD_{578} 为 2.0。

迈氏热厌氧杆菌 A3M4 介质

用于培养迈氏热厌氧杆菌菌株 A3M4 的是前面(Angelidaki 等, 1990)描述的 BA 介质，但是要用不含半胱氨酸的 1 克/升的酵母提取物修正。将该介质用 0.25 克/升硫化钠还原。起始 D-木糖浓度为 5 克/升并将其在 70 摄氏度和 PH 值为 6.8 的条件下培养。将培养一夜生长在带有 55 克/升木糖的 BA 培养物用作发酵实验中的接种物。瓶内用于接种的 OD_{578} 值为 0.8。

混合介质

该混合合成介质(用于啤酒糖酵母和迈氏热厌氧杆菌的培养)，CSM，包括 BA 介质加上原液来用作酵母介质：痕量金属、维生素和麦角固醇/吐温 80。向介质中添入 12 克/升葡萄糖和 5 克/升木糖。用光密度(OD_{578})对其生长状况进行评估。混合麦草介质(CWSM)包含经过湿法氧化处理后的麦草并加入同样浓度的盐、痕量金属、维生素和麦角固醇/吐温 80 作为 CSM，而不添加葡萄糖和木糖。

乙醇发酵

乙醇发酵是在盛有 100 毫升介质的 300 毫升血浆瓶中进行的。将经过湿法氧化处理混合后的麦草介质(CWSM) 用前面所描述的 CelluClast 进行预处理。将 pH 值调至 6.0, 用啤酒糖酵母 进行培养使其 ODS78 的计算值达到 0.05, 并在一个水平的搅拌器上以每分钟 200 转的转速, 在 30 摄氏度时培养五天。在酵母发酵结束后, 在加入 5% 迈氏热厌氧杆菌 A3M4 (最终浓度) 接种培养物之前, 用 1% 的氢氧化钠将取自无菌厌氧原液的悬浮物的 pH 值调至 6.8。在 70 摄氏度并且没有搅拌的情况下, 对其进行为期五天的嗜热发酵。

3.1.4 蒸馏

在用迈氏热厌氧杆菌 A3M4 进行发酵后, 将取自盛有用 CelluClast 酶促水解后的 CWSM 的乙醇蒸馏出来。为了确保将乙醇蒸馏出来, 安装一个 30 厘米垂直水冷却系统, 将其加热到 70 摄氏度, 并用 N₂/CO₂ (4:1) 气体吹脱 1.5 小时。

3.1.5 甲烷的生产

甲烷细菌接种物用生活垃圾作为基质在 55 摄氏度下连续搅拌的厌氧反应器。

接下来将剩余的悬浮物用 10% v/v 的厌氧接种物接种, 并在 55 摄氏度下无搅拌培养。

3.1.6 分析方法

将发酵液的样品(1 毫升) 用 30 微升 17% 的磷酸酸化以确定乙醇和乙酸的含量。在 HP5890 系列 II 带有火焰离子探测和硅毛细管柱的气相色谱仪上分析 (交叉联合聚乙烯乙二醇-TPA, 30 m, 0.53 mm)。按照 (Angelidaki, L, 1990) 所描述的方法测量甲烷。按照美国的标准测量 COD。在 578 nm 时, 用光谱仪(Milton Ron) 测量 OD₅₇₈。用通过数据点的中间对数增长(4 至 12 小时之间) 线性回归所表示的 mM EtOH 来确定乙醇的体积产率。

3.1.7 酚类水解酶的分析

在 4 摄氏度时, 将液体部分或者发酵液以每分钟 10000 转的转速离

心分离 10 分钟。用 1 摩尔的氢氧化钠和 1 摩尔的盐酸将上清液的 pH 值分别调至 6.9--7.1 和 1.9--2.1。在 pH 值为 7 和 2 时，用固相的提取物将酚类和 2-呋喃甲酸从液体部分中分离，并用乙酸乙酯(Isolute ENV+ 100 毫克/毫升, IST) 分别将他们提取出来。用 pH 值为 7 时的萃取物确定苯类酚醛和酚酮的量。用 pH 值为 7 时的萃取物以三甲基定苯类酚醛和酚酮的量。用 pH 值为 2 的萃取物以三甲基硅烷的衍生物来确定苯酸和 2-呋喃甲酸的量。将 pH 值为 7 时的萃取物用乙腈稀释并用硫酸钠干燥。在 70 摄氏度时用 BSTFA (N,O-Bis(三甲基硅烷) 三脒-乙酰胺) 和乙腈(1:5) 的混合物硅烷化 30 分钟。酚类是用可靠的标准，通过 DC-MS 和 GC-FID，在带有 0.25 微米的苯基交叉键的熔合硅毛细管(HP-5, Agilent Technologies, USA 或 XTI-S, Restek Corp., USA) 上分析来定量的。

3.3. 结果

将经过湿法氧化处理后的麦草进行发酵产生乙醇，60 克/升麦草会产生 138.7 mM 的乙醇。其中，110 mM 乙醇是由啤酒糖酵母产生的，28.7 mM 乙醇是由迈氏热厌氧杆菌产生的。除此以外，在嗜热木糖发酵步骤中会产生 10.1 mM 的乙酸。乙醇生产所产生的废液在经过蒸馏之后通过嗜热甲烷生成菌的聚生物 Archaea 转化为甲烷。每吨麦草会产生 77.6 m³ 的甲烷(见表 4) 并且在甲烷产生步骤中 71% 的 COD 被除去。

麦草湿法氧化过程中所产生的潜在发酵抑制物质可以在乙醇生产过程的重要时刻检测到。从表 3.1 中可以看出，几乎所有的酚醛(4-羟基苯甲醛) 和香草醛都被啤酒糖酵母所代谢，部分的丁香酸也被啤酒糖酵母所代谢。但是丁香酸的浓度转回到木糖被迈氏热厌氧杆菌发酵前的水平，这表明嗜热微生物合成了丁香酸。除此以外，经过嗜热发酵后，4-羟基苯甲酸的浓度也有所增加。其它酚类化合物，酒精类，醛类，戊糖的降解产物，酮类和酸类均没有被啤酒糖酵母或者迈氏热厌氧杆菌所代谢。由于啤酒糖酵母对 4-羟基苯甲醛和香草醛的转化，在中温己糖发酵过程中所测得的酚类化合物的总浓度会有所下降。在所有的小分子羧酸中，其中 23.5 mM 的乙酸是在麦草的预处理过程中产生的，另外有 10.1 mM 的乙酸是由迈氏热厌氧杆菌对混合酸发酵时形成的。在嗜热厌氧废水处理

理过程中酚类化合物，戊糖的降解产物和乙酸都被转化为甲烷。在起始浓度为 158.8 毫克/升的酚类化合物当中，有 4.0 毫克/升仍然残留在处理后的废水当中。在起始浓度为 33.2 mM 的乙酸当中，1.8 mM 没有被代谢。这相当于去除了 97%的酚类，去除了 94%的乙酸。

这些结果清楚的表明乙醇发酵废水中的抑制性物质可以被降低到一个很低的水平，以使得部分或者全部处理后的废水可以回用到工艺当中去，而其中的抑制性物质既不会抑制木质纤维素生物物质的预处理，也不会抑制接下来的水解和糖类的发酵。

表 3.1 乙醇发酵过程的重要时刻所测得的潜在的发酵抑制物质

酚类 mg/l	啤酒糖酵母， 起始时	啤酒糖酵母，结 束时 迈氏热厌氧 杆菌，起始时	迈氏热厌氧杆菌， 结束时，Ww-处理， 起始时	Ww-处理， 结束时
酚	4.5	3.9	3.8	0.9
愈创木酚	8.5	8.0	8.2	0.0
丁香酚	2.3	2.8	3.6	0.0
4-羟基苯甲醛	13.7	0.9	0.6	0.0
香草醛	10.6	1.9	1.1	0.1
丁香醛	3.6	3.2	2.6	0.3
4-羟基苯乙酮	2.8	2.5	2.7	0.2
加拿大麻素	5.0	5.0	4.9	0.2
乙酸丁香酮	17.4	19.0	20.0	1.9
2-呋喃甲酸	7.2	6.2	6.5	0.0
4-羟基苯甲酸	23.7	22.8	26.0	0.0
香草酸	32.3	31.2	30.6	0.1
丁香酸	20.2	16.1	19.0	0.1
p-香豆酸	5.0	5.1	4.7	0.0
阿魏酸	2.1	3.4	3.0	0.2
总酚	158.8	131.9	137.4	4.0
乙酸	23.5	23.0	33.2	1.8

参考文献

Ahring, B.K., Jensen, K., Nielsen, P., Bjerre, A.B. & Schmidt, A.S. 1996. Pretreatment of wheat straw and conversion of xylose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria. 58: 107-113.

Angelidaki 等, 1992, Biotechnology and Bioengineering 39:351-353.

Angelidaki, I., Petersen, S.P. & Ahring, B.K. 1990. Effects of lipids on the anaerobic digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite. Applied Microbiology Biotechnology 33:469-472.

Bailey & Ollis. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill, International Edition, Chemical Engineering Series.

Goering and Soest. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications).pp. 1-20. In: Agricultural handbook No. 379. Agricultural Research Services, USDA, Washington DC.

Larsen, L., Nielsen, P., & Ahring, B.K. 1997. *Thermoanaerobacter mathranii* sp.

nov., an ethanol producing extremely thermophilic bacterium from a hot-spring in Iceland. Arch Microbiol 168: 114-119.

Puls, J. 1993. Substrate analysis of forest and agricultural wastes, pp.13-32. In: J.N. Saddler (ed.), Bioconversion of forest and agricultural plant residues. CAB International, Wallingford, UK.

Saddler, J.N., Ramos, L.P., Breul, C. 1993. Steam pre-treatment of lignocellulosic residues, pp. 73-91. In: J.N. Saddler (ed.), Bioconversion of

forest and agricultural plant residues. CAB International, Wallingford, UK.

Schmidt, A.S. & Ahring, B.K.1996. Biotechnology and Bioengineering 49(3):229-246.

Schmidt, A.S. & Thomsen, A.B. 1998. Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. Biores. Biotechnol. 64: 139-151.

Sonne-Hansen, J., Mathrani, I.M. & Ahring, B.K. 1993. Xylanolytic anaerobic thermophiles from Icelandic hot-springs. Applied Microbiology and Biotechnology, 38:537-541.

Taherzadeh, M.J., Niklasson, C., & Lidén, G. 1997. Acetic acid-foe or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. Chem Eng Sci 52:2653-2659.

图 1

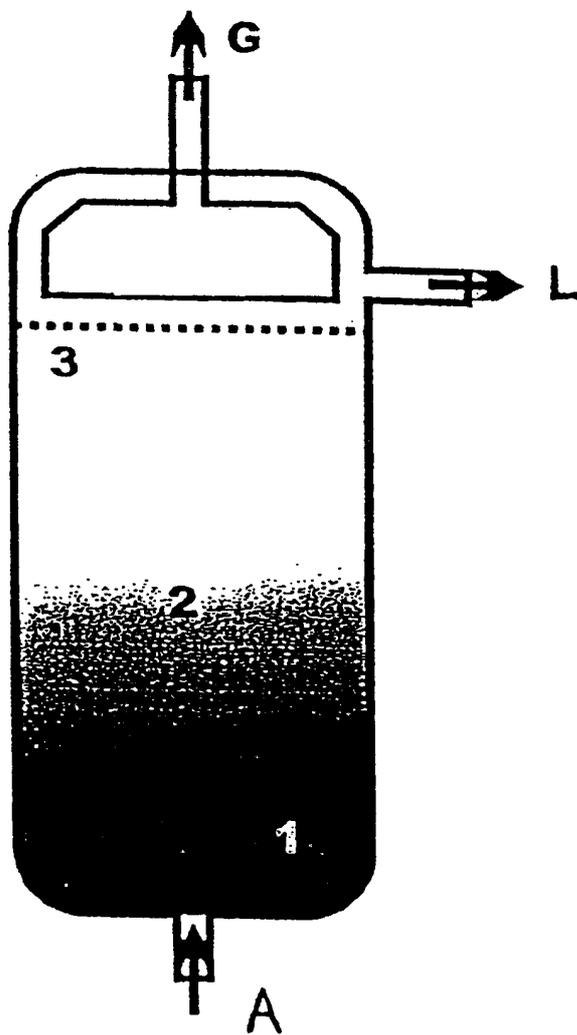


图 2

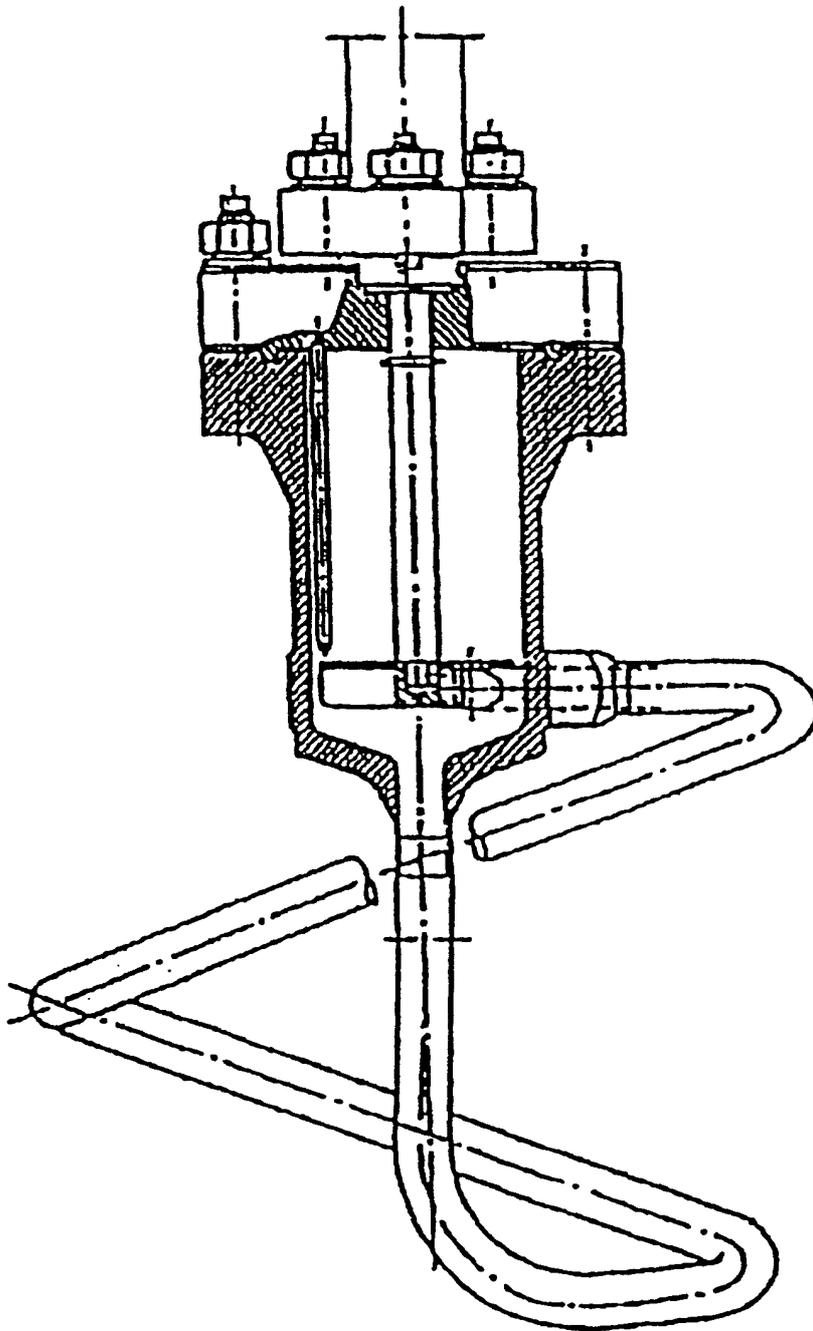


图 3

